DIE FORMOSE-REAKTION, PRODUKTVERTEILUNG UND INTERMEDIÄR AUFTRETENDE CO-KATALYSATOREN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Alexius Ridwan Hernanto

aus Semarang / Indonesien

~~1984~~
1983

DIE FORMOSE-REAKTION, PRODUKTVERTEILUNG UND INTERMEDIÄR AUFTRETENDE CO-KATALYSATOREN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Alexius Ridwan Hernanto

aus Semarang / Indonesien

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.1983

Dekan	Professor Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Voelter
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Heller

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1977 bis April 1983 an der Abteilung für Physikalische Biochemie, Professor Dr. Wolfgang Voelter, am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen, unter Anleitung von Dr. H.Bauer durchgeführt.

Herrn Professor Dr. W.Voelter danke ich für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H.Bauer danke ich für die wertvollen Anregungen und Ratschläge und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547616_0004

für

Utari und Luis

Abstract

Alexius Ridwan Hernanto

DIE FORMOSE-REAKTION, PRODUKTVERTEILUNG UND INTERMEDIÄR AUFTRETENDE COKATALYSATOREN.

Bei der autokatalytischen Reaktion von Formaldehyd in alkalischer Lösung zu einem sirupösen Gemisch von Kohlenhydraten, auch als Formose-Reaktion bekannt, werden in einem mechanistisch noch nicht endgültig geklärten Schritt zunächst aus zwei Molekülen Formaldehyd ein Molekül Glycolaldehyd gebildet.

Danach werden höhere Kohlenhydrate sehr rasch in großen Mengen gebildet, die im weiteren Reaktionsverlauf wieder verschwinden. Bei lägerer Reaktionsdauer entstehen durch Umlagerungsreaktionen (Formose-Sekundärreaktion) isomere Kohlenhydrate über die entsprechenden Endiolate. Diese reagieren durch Selbst- oder Mischaddition zu höheren Zuckern oder gehen Rückspaltungsreaktionen ein. Durch ß-Eliminierung und eine Art Benzilsäure-Umlagerung entstehen Saccharinsäuren und weitere Rückspaltungsprodukte.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Kinetik und der Produktverteilung der durch Alkali- und Erdalkalihydroxid-katalysierten Formose-Reaktion. Zum besseren Verständnis wurden, soweit möglich, Einzelschritte der Sekundär- und Tertiärreaktion isoliert bearbeitet. Die Kinetik und die Produktverteilung der Lobry de Bruyn - Alberda van Ekenstein-Umlagerung wurde an Triosen, Tetrosen, Pentosen und Hexosen unter dem Einfluß verschiedener Alkalihydroxide, Temperatur und Konzentration verfolgt. Die Bildung saurer Folgeprodukte, meist Saccharinsäuren, konnte auf diese Weise ebenfalls qualitativ und quantitativ erfaßt werden.

Durch präparative Chromatographie konnten neben den erwarteten "normalen" Triosen, Tetrosen, Pentosen und Hexosen, verzweigte und höhere Zucker, Heptosen und Oktosen,isoliert werden. Diese Kohlenhydrate sind offensichtlich starke Endiolatbildner, die wahrscheinlich für den autokatalytischen Verlauf der Reaktion, zumindest als Cokatalysatoren, verantwortlich sind.

Mit Hilfe des Zuckeranalysators und der gekoppelten Gaschromatographie und Massenspektrometrie konnte die Struktur der isolierten höheren, intermediär entstehenden Zucker aufgeklärt werden.

Ferner wurde die Produktverteilung der Formose-Reaktion bestimmt. Von 90 aufgetrennten Verbindungen konnte in der überwiegenden Zahl aufgrund der erhaltenen Daten die Struktur ermittelt werden.

Inhaltverzeichnis

		Seite
I)	ALLGEMEINER TEIL	
1.	Einleitung	1
2.	Umsetzung von Formaldehyd mit Alkali- und Erdalkalihydroxiden	4
3.	Umsetzung von Formaldehyd mit Calciumhydroxid	10
4.	Bildung von Saccharinsäuren (Formose - Tertiärreaktion)	21
5.	Rückspaltungsreaktionen	39
6.	GC-MS der (per-)trimethylsilylierten, hydrierten bzw. deuterierten Formose	42
7.	Präparative Auftrennung der Formose	96
8.	Umsetzung von Dihydroxiaceton mit Calciumhydroxid	128
9.	Diskussion	142
II)	EXPERIMENTELLER TEIL	
1.	Bestimmung der Formaldehydkonzentration	145
1.1.	Konzentration der Formaldehydlösung	145
1.2.	Bestimmung der Formaldehydkonzentration in den Reaktionsprodukten	146
2.	Umsetzung von Formaldehyd mit Alkalimetall (Li, Na, K) - hydroxiden	147
3.	Darstellung von Formose-Reaktion (Zwischen- und Endprodukte)	147
4.	Darstellung von Dendroketose	148
5.	Darstellung von D - Glucoisosaccharinsäure	149
6.	Darstellung von D - Glucometasaccharinsäure	149

Seite

7. Präparative Trennung mit Flüssigkeits-chromatographie 151

8. Trennung mit dem Zuckeranalysator 152

9. Darstellung von reduziertem Zucker durch Hydrierung mit Natriumborhydrid ($NaBH_4$) 158

10. Darstellung von deuteriertem Zucker 158

11. Gaschromatographie-Massenspektrometrie 158

III) LITERATUR 160

1. Einleitung

Die Formose-Reaktion ist eine autokatalytische Reaktion von Formaldehyd in Anwesenheit von Metallhydroxiden zu einem Gemisch von Zuckeraufbau- und Folgeprodukten. BUTLEROW[1] berichtete schon 1861 über diese Reaktion. KUSIN[2] und LANGENBECK[3] haben später den autokatalytischen Reaktionsablauf untersucht und bestätigt.

Von bisherigen zahlreichen Untersuchungen ist wohl bekannt, daß in den ersten Reaktionsstufen Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton gebildet werden. Die weiteren Umsetzungen (Sekundärreaktion) bestehen im wesentlichen in der Reaktion der obengenannten Stoffe untereinander bzw. mit Formaldehyd zu höheren Kohlenhydraten wie Hexosen, Heptosen usw. Die so gebildeten Produkte fungieren praktisch als zusätzliche Co-Katalysatoren[4]. Die anfängliche Stufe bezeichnet man als Induktionsperiode, wobei nur die Cannizzaro-Reaktion (Disproportionierung) abläuft, d.h. Abnahme der Formaldehydkonzentration, bei ständiger Zunahme von Säure und keine Bildung der Formose (Abb. 1); danach setzt die autokatalysierte Stufe, die Bildung der Formose, ein. In diesem Zeitraum wird die Induktionsperiode beendet und die Konzentration der gebildeten Zucker steigt sehr schnell an. Gleichzeitig schlägt die Lösungsfarbe von farblos über gelb zu braun um.

Unter diesen Reaktionsbedingungen geht die gebildete Formose zahlreiche weitere Umsetzungsreaktionen ein. Meist erfolgt zunächst die Bildung von Endiolaten, mit anschließen-

der Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein-Umlagerung[45-47] zu den korrespondierenden Aldosen bzw. Ketosen.

Mit zunehmender Reaktionsdauer wird das Auftreten weiterer Zuckerumlagerungs- und Abbauprodukte, wie z.B. Saccharinsäuren beobachtet, die durch ß-Eliminierung und anschließende Benzilsäure-Umlagerung, entstehen.

Der zuletzt genannte Reaktionsschritt wird im weiteren als tertiäre Formose-Reaktion bezeichnet. Die Endprodukte der Formose-Reaktion wurden in früheren Arbeiten mittels Papierchromatographie bestimmt[5-6].

Mehr Information über die Produktverteilung und den Ablauf dieser Formose-Reaktion war durch die Anwendung des Zuckeranalysators, eines Flüssigkeitschromatographen auf Ionenaustauschbasis, zu erhalten. Damit gelingt nicht nur die analytische Erfassung der Endprodukte, sondern auch Zwischenprodukte (= intermediär) können sowohl qualitativ als auch quantitativ erfaßt werden.[48]

Einige Autoren[7-9] postulieren das Auftreten höherer Zucker in der Übergangsphase von der Cannizzaro-Reaktion zur Formose-Reaktion. Solche intermediär gebildete Zucker (z.B. Heptosen, Oktosen) sind relativ instabil, könnten aber als starke Endiolbildner für den autokatalysierten Verlauf der Reaktion mit verantwortlich sein.

Bislang war jedoch der Nachweis solcher, möglicherweise verzweigter höherer Zucker nicht gelungen. Mit Hilfe des Zukkeranalysators konnte eine Gruppe von drei bis vier Komponenten chromatographisch erfaßt werden, deren Auftreten gerade mit dieser Übergangsphase zusammenfällt. Mittels prä-

parativer Chromatographie können diese Zucker, verzweigte Heptosen und Oktosen, als farblose Öle isoliert werden.
Eine weitere wertvolle analytische Methode zur besseren Erfassung der Produktverteilung ist die gaschromatographische Auftrennung geeigneter Formose-Derivate. Die Formose-Produkte werden mit $NaBH_4$ bzw. $NaBD_4$ reduziert, danach in flüchtige Derivate, meist Pertrimethylsilyether überführt. Anschließend werden mit der gekoppelten Gaschromatographie und Massenspektroskopie (= GC-MS) Massenspektren der getrennten Komponenten aufgenommen und diese Daten für die Strukturaufklärung herangezogen.
Das während der Induktionsperiode überwiegend entstehende Dihydroxyaceton (= C_{3K}) dimerisiert sich unter anderem zu einer verzweigten Ketohexose der Dendroketose. Eine präparative Trennung auf Ionenaustauscherbasis wird hier durchgeführt, um die Dendroketose in reiner Form zu isolieren.
Eine geringe Anreicherung der Dendroketose nach dem Anspringen der Formose-Reaktion wird nachgewiesen, allerdings verschwindet diese wieder rasch nach weiterem Reaktionsverlauf.
Aus Glycerinaldehyd bildet sich nach vollständigem Formaldehyd-Umsatz durch Selbstaddition, Dendroaldose[10]. Neben diesen verzweigten Hexosen konnten höhere verzweigte Aldosen und Ketosen isoliert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist neben der Untersuchung der Produktverteilung der Formose-Reaktion, die Erfassung während der Sekundärreaktion ablaufender Einzelschritte, vor allem aber die Erfassung autokatalytisch wirksamer intermediär entstehender Produkte.

2. Umsetzung von Formaldehyd mit Alkali- und Erdalkalihydroxiden

Formadehyd läßt sich in alkalischem Milieu bei Gegenwart geeigneter Kationen zu einem Gemisch von Kohlenhydraten umsetzen. Ob die Formose-Reaktion in Anwesenheit von Alkalihydroxiden (LiOH, NaOH, KOH) bzw. Erdalkalihydroxiden ($Ca(OH)_2$) nach einem homogenen oder heterogenem Mechanismus abläuft, wird von ORESTOV[11)] durch seine kolometrischen Meßergebnisse als ein Kompromiß in folgender Weise formuliert: "Die Formose-Reaktion verläuft in zwei Phasen - einer homogenen katalysierten Induktionsphase und einer heterogen katalysierten Kondensationsphase. Je nach Reaktionsführung (Dauer, Temperatur, Konzentration oder gewählter Base) werden mehr oder weniger Nebenprodukte erhalten."
Bei längerer Reaktionsführung kommt es verstärkt zur "Säurebildung", die vorwiegend nach einer ß-Eliminierung mit anschließender Umlagerung ablaufen dürfte.

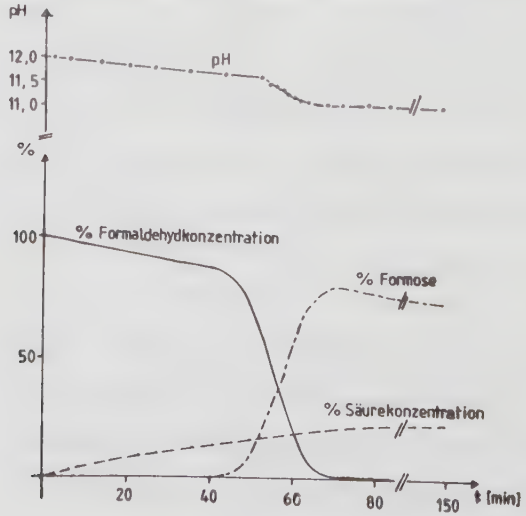


Abb. 1:

Kinetik der Formose-Reaktion:
1,0 M Formaldehyd + 1% $Ca(OH)_2$, N_2, 50 °C

Die Säurebildung ist nicht allein auf die Cannizzaro-Reaktion zurückzuführen, denn sonst müßte die Säurekonzentration nach dem vollständigen Verbrauch des Formaldehyds keine Zunahme mehr aufweisen. Tatsächlich wird jedoch hier (Abb. 1) ein weiterer Anstieg der Säurekonzentration beobachtet. Eine ß-Eliminierung und anschließende Umlagerung zu isomeren Säuren, nämlich Saccharinsäuren, könnte hierfür verantwortlich sein.

Diese Folgereaktionen werden in einem späteren Abschnitt näher untersucht.

Außer der Säurebildung erhält man auch teilweise höhere Zukker wie Heptosen, Oktosen usw., die jedoch instabil sind Die Konzentration des Formaldehyds spielt hier wohl eine wichtige Rolle[10, 12].

Nach sorgfältiger Untersuchung wird festgestellt, daß die Reaktion um so schneller abläuft, je verdünnter man den Formaldehyd wählt. In Abb. 2 und Tab. 1 ist deutlich zu sehen, daß die Temperatur den Reaktionsverlauf entscheidend beeinflußt.

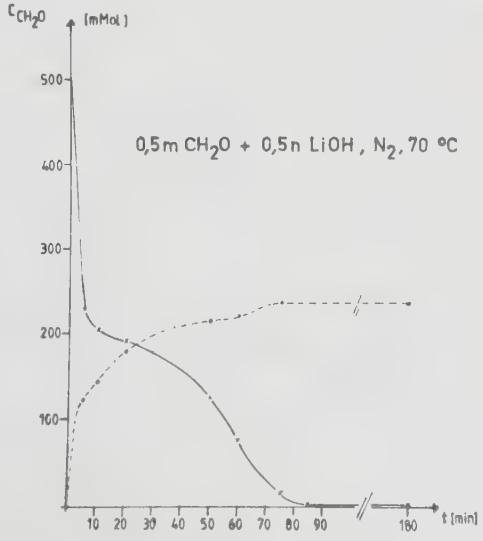
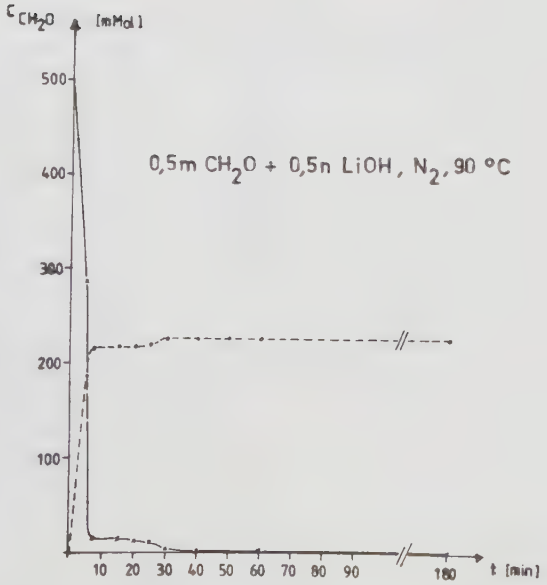


Abb. 2a:
C/T-Diagramm von Formaldehyd in Lithiumhydroxidlösung

——— Formaldehydkonzentration
- - - - - - Säurekonzentration



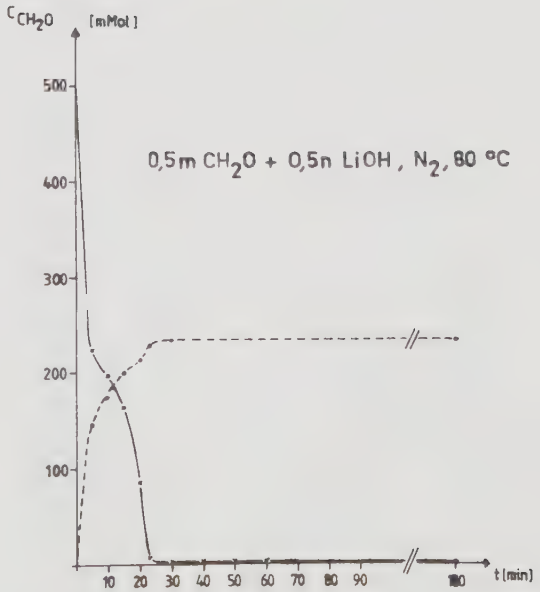


Abb. 2b und 2c: C/T-Diagramm von Formaldehyd in Lithiumhydroxidlösung

———— Formaldehydkonzentration — — — Säurekonzentration

Tab. 1 : Temperaturabhängigkeit der Dauer der Induktionsperiode bei der Formose-Reaktion: Umsetzung von Formaldehyd mit Alkalihydroxiden bei verschiedenen Temperaturen

Temp. (°C)	LiOH	NaOH	KOH
60	-	40 min	32 min
70	24 min	20 min	18 min
80	12 min	10 min	8 min
90	6 min	-	-

Die Durchführung dieser Untersuchungen erfolgt in einem speziell angefertigten Reaktionsgefäß, das in Abb. 3 ersichtlich ist.

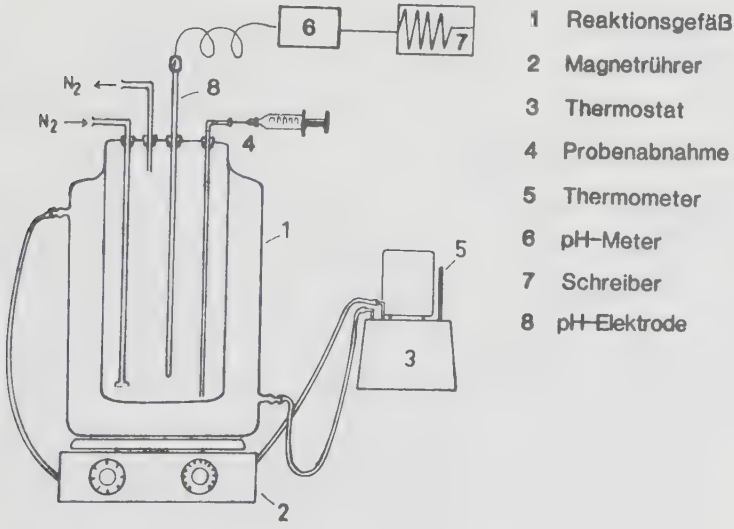


Abb. 3 : Reaktionsapparatur zur Durchführung der Formose-Reaktion

Eine Elektrode, die an ein pH-Meter und einen Schreiber angeschlossen ist, kontrolliert den Verlauf der pH-Wertänderung der Reaktion.

Von Zeit zu Zeit werden Proben für die Bestimmungen der Säurebildung und noch vorhandener Formaldehydkonzentration entnommen. Die Säurekonzentration wird mit 0,1 N HCl acidimetrisch bestimmt, d.h. der Überschuß an Base zurücktitriert. Die Formaldehydkonzentration wird mit 1%-iger Chromotropsäure als Farbreagenz mit dem Zuckeranalysator photometrisch bei 570 nm bestimmt. Die Untersuchungen ergeben, daß die Kondensationsgeschwindigkeit von LiOH über NaOH, KOH und $Ca(OH)_2$ eine aufsteigende Tendenz zeigt.

In Abb. 4 ist der Reaktionsverlauf der Formose-Reaktion bis zu den Hexosen und den entsprechenden Umlagerungs- bzw. Abbauprodukten schematisch dargestellt.

Aus Formaldehyd entsteht demnach zunächst Glycolaldehyd, der durch succesiven Aufbau bzw. Mischadditionen in die entsprechenden Kohlenhydrate übergeht.

Im Reaktionsschema sind solche Aufbaureaktionen, die Umlagerungsreaktionen über Endiolatbildung und direkte Rückspaltungen eingezeichnet. Rückspaltungsreaktionen, die nicht Hydroxicarbonyle liefern, sowie die höheren und verzweigten Produkte sind nicht eingetragen.

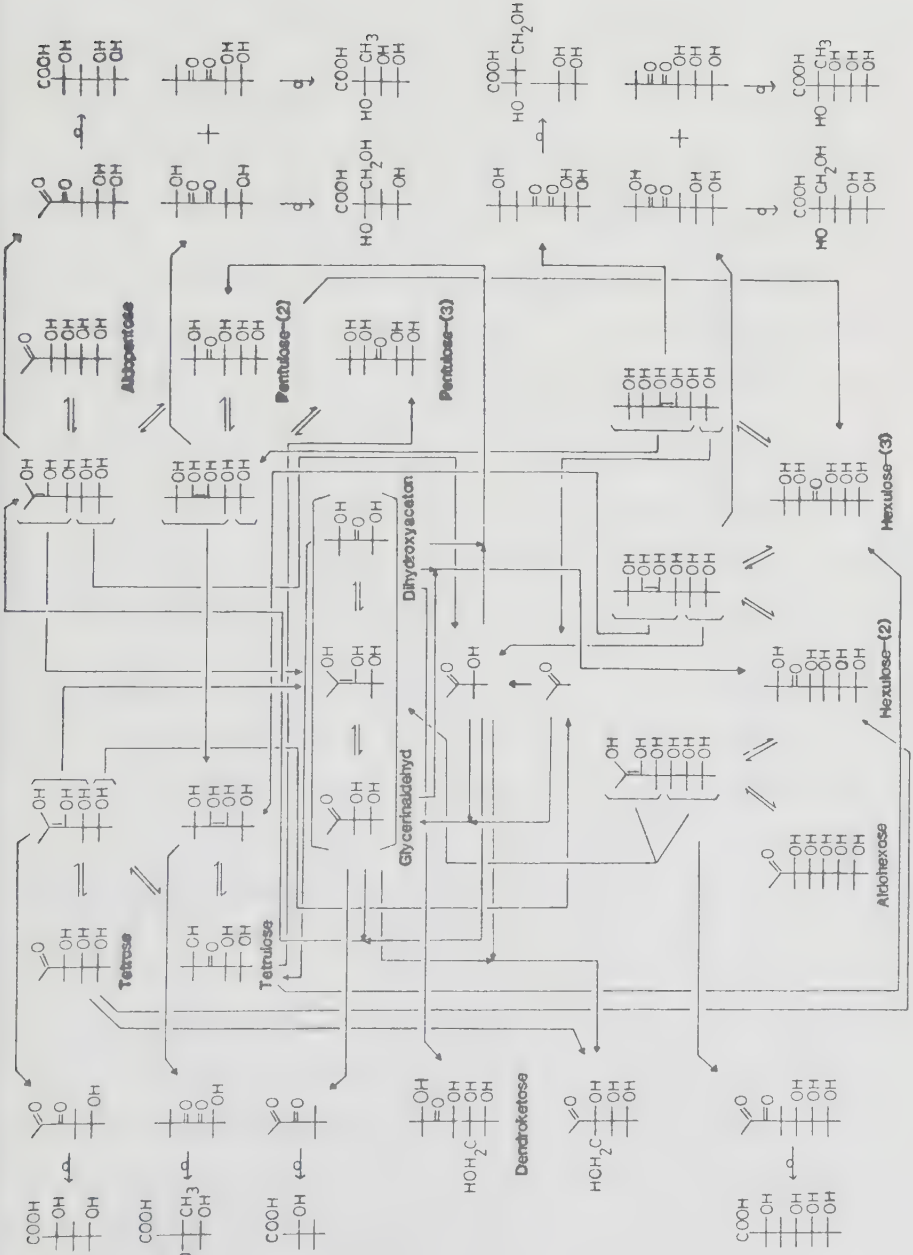


Abb. 4: Übersichtsschema der Formose-Reaktion

3. Umsetzung von Formaldehyd mit Calciumhydroxid

Für die Untersuchung der Zwischen- und Endprodukte der Formose-Reaktion wird 1 Mol/l Formaldehydlösung und 1% Calciumhydroxid unter Stickstoffatmosphäre und ständigem Rühren bei 50° C in einem geschlossenen System durchgeführt (vgl. Abb. 3). Der Gehalt der Formaldehydlösung wird mittels mercurimetrischer Titration bestimmt[13]. Bei der anfänglichen Induktionsperiode nimmt die Konzentration des Formaldehyds kontinuierlich ab und die Konzentration der Säure steigt langsam an (vgl. Abb. 1). Nach etwa 60 min springt die Reaktion an. Während dieser Übergangsperiode, von der Cannizzaro- zur Formose-Reaktion wird ein schneller Farbumschlag von farblos zu gelb beobachtet. Bis zu diesem Umschlagspunkt werden Proben in kürzeren Zeitabständen (1 min) von dem Reaktionsgefäß entnommen, sofort mit 0,1 Mol/l Oxalsäure neutralisiert (pH 5-6) und damit der Überschuß von Calciumhydroxid in Calciumoxalat übergeführt. Danach wird keine Weiterreaktion beobachtet. Auf diese Art konnte die Produktverteilung verfolgt werden. Die bereits neutralisierten Reaktionsgemische werden unter Vakuum eingeengt und mit Hilfe des Zuckeranalysators weiter untersucht. Aus Abb. 5 bis 7 ist deutlich zu erkennen, daß am Anfang der Formose-Übergangsperiode (vgl. Abb. 6) innerhalb kürzester Zeit eine ganze Reihe intermediärer Produkte gebildet werden, die offensichtlich rasch wieder zerfallen. Bei den nach der Glucose eluierten Substanzen dürfte es sich aufgrund des chromatographischen Verhaltens um höhere Zucker oder zumindest um starke Endio-

latbildner handeln (Abb. 7). Es wird vermutet, daß diese intermediären Produkte die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen, d.h. als Co-Katalysatoren wirken.

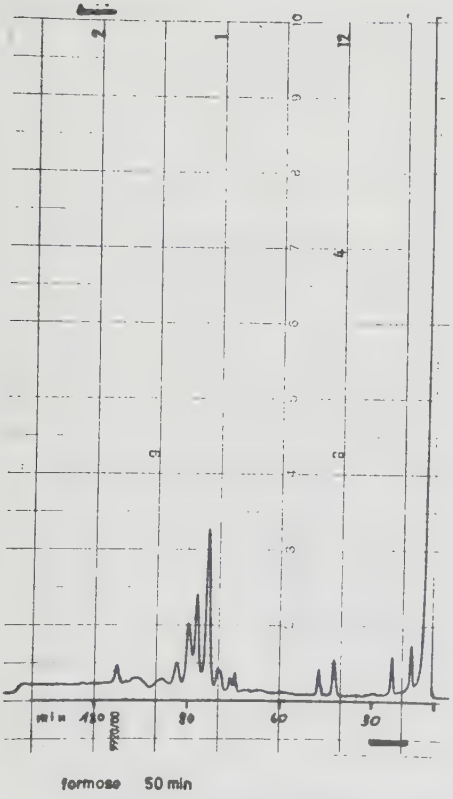


Abb. 5: Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) der Umsetzung von Formaldehyd in alkalischer Lösung nach 50 min Reaktionsdauer.

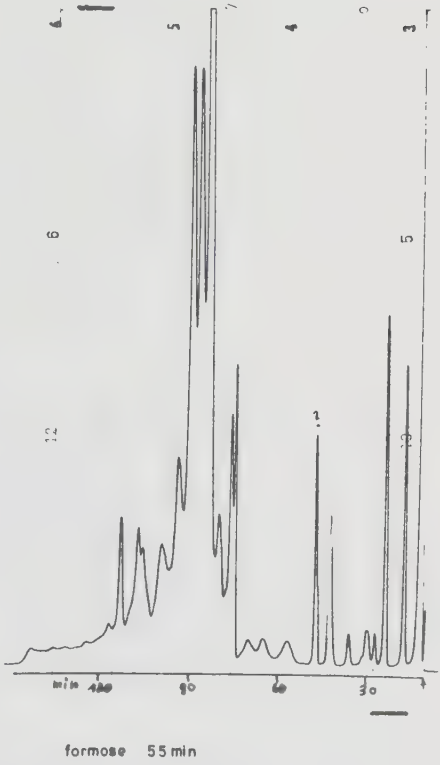


Abb. 6: Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) der Umsetzung von Formaldehyd in alkalischer Lösung nach 55 min Reaktionsdauer.

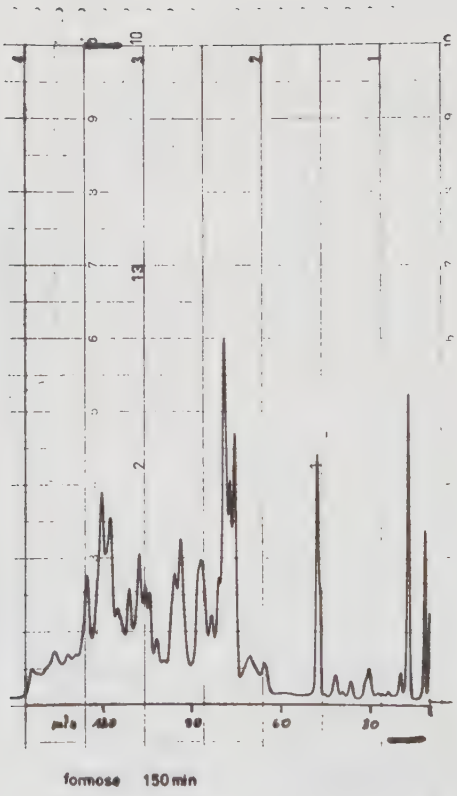


Abb. 7: Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) der Umsetzung von Formaldehyd in alkalischer Lösung nach 150 min Reaktionsdauer.

Am Anfang der Formose-Reaktion bildet sich aus zwei Formaldehydmolekülen ein Molekül Glykolaldehyd(= C2A). Dieser Schritt verläuft autokatalytisch[7, 19] und wird als Formose-Primärreaktion bezeichnet. Der Reaktionschritt ist noch weitgehend ungeklärt. Da Formaldehyd mit Calciumhydroxid salzartige Bis-methylenglykolat-Komplexe bildet[12] scheint wahrscheinlich, daß hieraus Endiolat-Komplexe entstehen. Der Mechanismus dieser Reaktion ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt. Solche Endiolat-Komplexe vermögen offensichtlich die Selbstaddition von Methylenglykol zu Glykolaldehyd zu katalysieren. Formaldehydhydrat könnte am Endiolat-Komplex gebunden und in Form eines Carbanions aktiviert werden (vgl. Abb.8)[10], das wiederum mit einem weiteren Molekül Formaldehydhydrat zu Glykolaldehyd weiter reagieren könnte. Dieser bildet entweder mit freiem Calciumhydroxid einen zusätzlichen Endiolat-Komplex (Autokatalyse) oder steht zum Aufbau höherer Zukker zur Verfügung. Die folgenden Aufbaureaktionen zu Triosen und höheren Zuckermolekülen, die weitgehend nach dem Aldoladditionsmechanismus verlaufen, werden als Formose-Sekundärreaktion bezeichnet.

Über die Bildung von Endiolaten mit anschließender Lobry de Bruyn - Alberda van Ekenstein-Umlagerung werden die korrespondierenden Ketosen bzw. Aldosen gebildet. So entsteht durch diese Umlagerung z.B. aus Glycerinaldehyd (= C_{3A}) Dihydroxiaceton (= C_{3K}).

Betrachten wir jetzt systematisch die weiteren Aufbaureaktionen[10] zu den höheren Zuckern, dann werden zuerst durch Selbstaddition von zwei Glykolaldehydmolekülen Tetrosen und durch Umlagerung die korrespondierende Tetrulose gebildet.

Durch Addition eines weiteren Moleküls Formaldehyd an Glykolaldehyd entstehen die korrespondierenden Triosen, Glycerinaldehyd und Dihydroxiaceton.

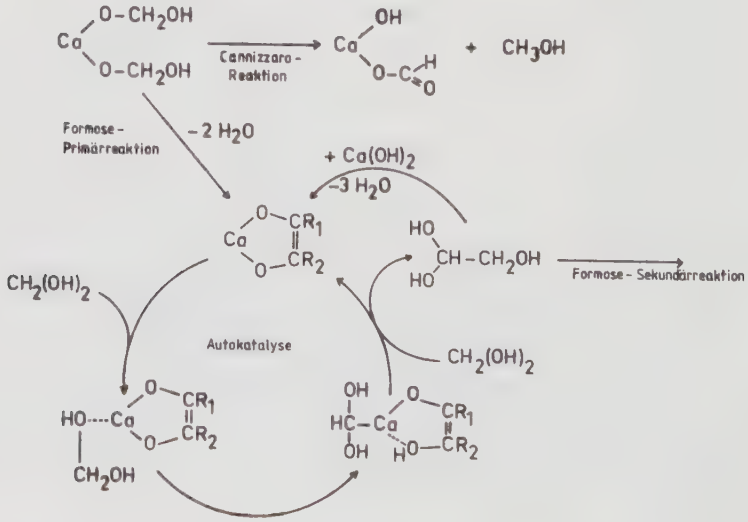
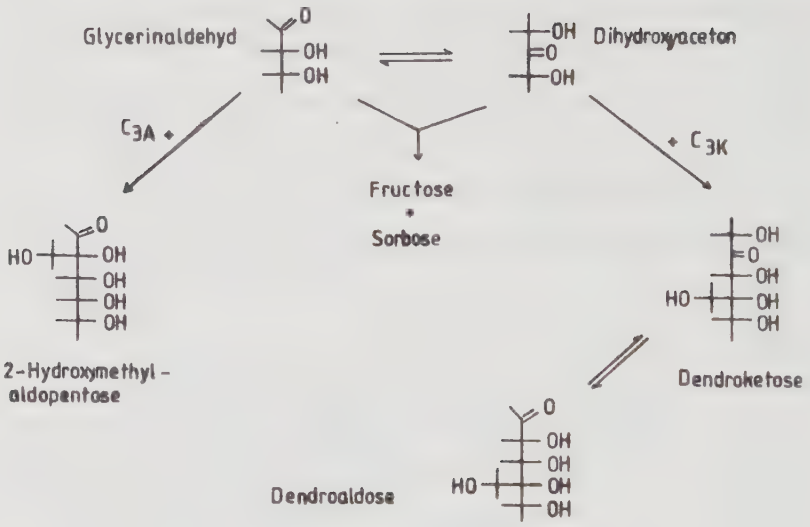


Abb. 8: Mechanismus der autokatalysierten Reaktion von Formaldehyd im Calciumhydroxidlösung[54].

Im weiteren Reaktionsverlauf addieren Tetrosen ein Molekül Glykolaldehyd unter Bildung von Hexosen (Aldo- und Ketohexosen).
Andererseits wurde auch die Rückspaltung von Erythrulose zu Dihydroxiaceton und Formaldehyd in früheren Arbeiten[21, 22] diskutiert. Aldotetrosen können sich im Gegensatz zur Ketoterose durch Furanosebildung stabilisieren, weshalb sie sicherlich nur in untergeordneter Weise weitere Aldoladditionsreaktionen eingehen.
Bei der Kondensation von Tetrosen mit Formaldehyd[5] werden Pentosen gebildet. Hauptsächlich werden Aldosen jedoch durch Kondensation von Triosen (Dihydroxiaceton) mit Glykolaldehyd, zuerst unter Bildung von Ketopentosen, die sich dann zu korrespondierenden Aldopentosen isomerisieren[20], gebildet. Bei dieser Kondensation sind Ketopentosen tatsächlich in geringen Mengen nachweisbar[5].

Die bisherigen Untersuchungen der Kondensaion von Glycerinaldehyd in alkalischem Medium zeigen, daß sich im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt Glycerinaldehyd teilweise zu Dihydroxiaceton isomerisiert. Verläuft eine Kondensation in diesem Gemisch, dann entsteht bevorzugt eine trans-Verknüpfung zu Fructose bzw. Sorbose. Die entsprechende cis-Verknüpfung zu Tagatose bzw. Psicose spielt hier nur eine untergeordnete Rolle. Außerdem führt die Selbstaddition von Glycerinaldehyd zu einer 2-Hydoximethylaldopentose. Das Hauptprodukt der Selbstaddition von Dihydroxiaceton ist überwiegend Dendroketose. Beide Produkte sind verzweigte Aldo-

bzw. Ketohexosen[6, 23].



Die Mischaddition zwischen Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton spielt nur eine untergeordnete Rolle, solange noch Formaldehyd in der Lösung vorhanden ist. Erst danach wird die Reaktion der Triosen miteinander spürbar. Bei der Untersuchung von Formose-Teilreaktionen wurde nach der Reaktionstrennung bei Anwesenheit von Formaldehyd eine starke Bevorzugung der Aldopentosen gegenüber den Aldohexosen nachgewiesen[10, 17]. Hier wurde wiederum Xylose als Alltransprodukt gegenüber anderen Aldopentosen stark bevorzugt. In vorherigen Untersuchungen[12] wurde vermutet, daß Heptosen und Oktosen in den entsprechenden Ketose-formen als intermediäre Produkte gebildet werden, die im weiteren Reaktionsverlauf sehr schnell wieder verschwinden.

Die Annahme, daß durch Mischaddition von Triosen mit Tetrulosen solche intermediäre Produkte gebildet werden könnten, wird in folgenden Reaktionsschemen dargestellt (vgl. Abb. 9-12).

a: Additionsprodukte von Glycerinaldehyd (C_{3A}) mit Tetrulose (C_{4K}).

Wenn Glycerinaldehyd als Carbonylkomponente und die Tetrulose als Methylenkomponenete fungieren, dann besteht die Möglichkeit der Verknüpfung an C-1 und C-3 der Tetrulose. Oder umgekehrt, wenn die Tetrulose als Carbonylkomponente fungiert, so entsteht eine zweifach verzweigte Ketoheptose, die theoretisch möglich, deren Bildung aber unwahrscheinlich ist.

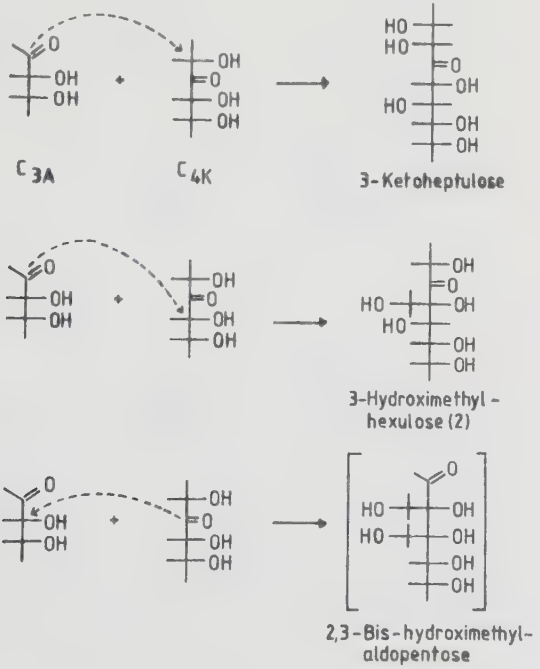


Abb. 9: Additionsprodukte von C_{3A} und C_{4K}

b: Additionsprodukt von Dihydroxyaceton (C_{3K}) mit Tetrulose (C_{4K}).

Analog zur Addition von C_{3A} mit C_{4K} kann hier Dihydroxyaceton sowohl als Carbonyl- als auch als Methylenkomponente fungieren.

Durch Verknüpfung von C_{3K} als Carbonylkomponente an C-3 der Tetrulose würde eine zweifach verzweigte Heptulose entstehen, deren Existenz jedoch nicht nachgewiesen werden konnte.

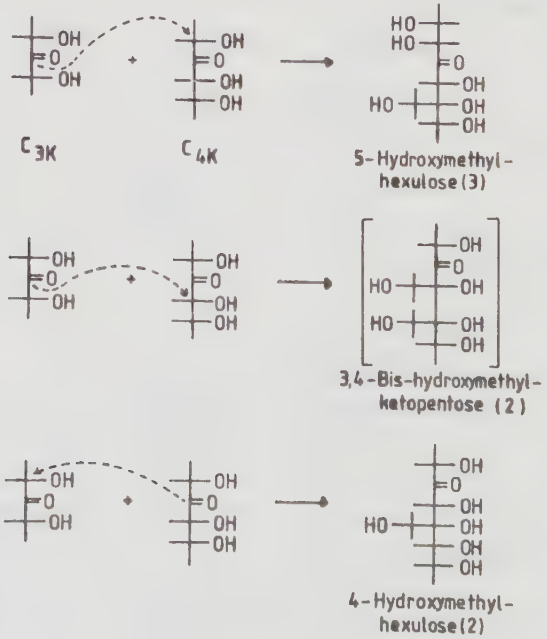


Abb. 10: Additionsprodukte von C_{3K} und C_{4K}

c: Selbstaddition von Tetrulosen.

Eine Reaktion der Carbonylkomponente an C-1 der Tetrulose ergäbe eine 3-Ketooktose, die an C-5 eine Hydroxymethylgruppe trägt. Eine weitere aber unwahrscheinliche Oktulose wäre eine 2-Ketooktose, die an C-3 und C-4 verzweigt ist.

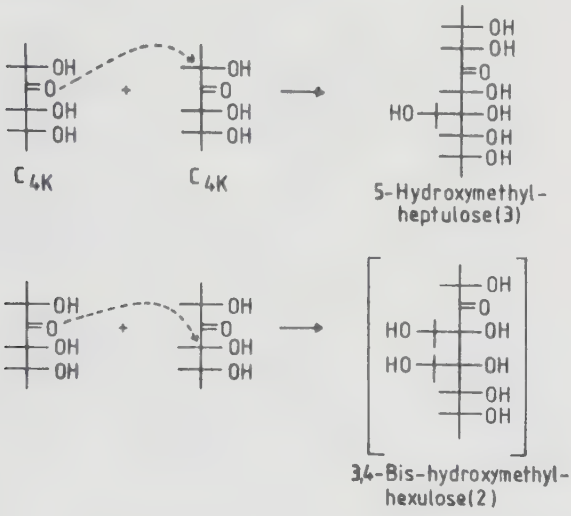


Abb. 11: Additionsprodukte von C_{4K} und C_{4K}

d: Additionsprodukte von C_{4A} mit C_{4K}.

Durch Isomerisierung entsteht ein Gleichgewicht zwischen Tetrose und Tetrulose, jedoch zu Gunsten der Terulose. Durch eine Mischaddition der beiden Isomerisierungsprodukte entstehen z.B. Oktulose (3) usw. (vgl. Abb. 12)

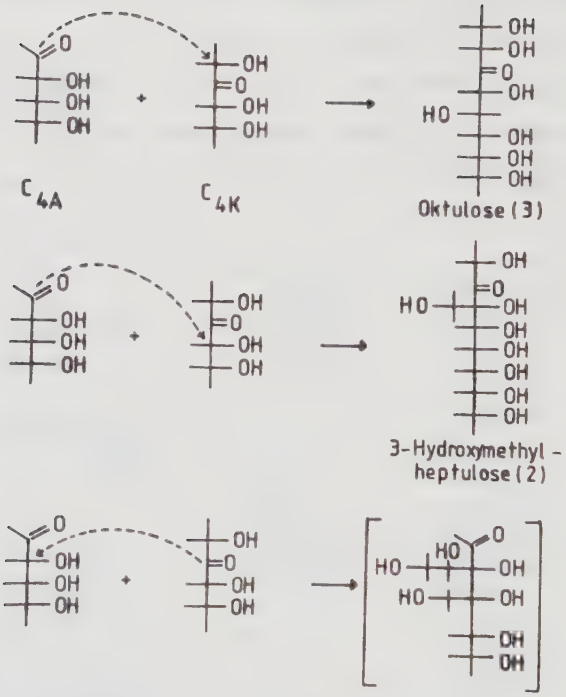


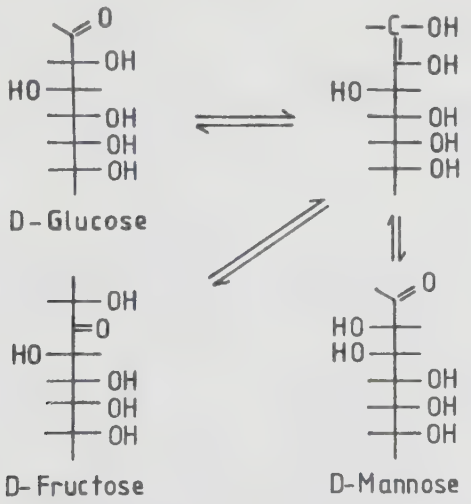
Abb. 12: Additionsprodukte von C_{4A} und C_{4K}

Auch hier ist die Verknüpfung von Tetrulose als Carbonylkomponente sehr unwahrscheinlich. In basischem Milieu werden nicht nur die zuvor diskutierten Aufbaureaktionen (Formose-Reaktion, Umlagerungen) sondern auch Rückspaltungsreaktionen[25-28], auch Retroaldol-Reaktion genannt, beobachtet. Aldosen bzw. Ketosen erleiden unter diesen Bedingungen eine Aufspaltung/Fragmentierung zu kleineren Bruchstücken. Dies gilt besonders für ß-Hydroxycarbonyl-Komponenten.

4. Bildung von Saccharinsäuren (Formose-Tertiärreaktion)

Die während der Formose-Reaktion (Sekundärreaktion) entstandenen Produkte (Monosaccharide usw.) erfahren alkalisch katalysierte Abbau- und Umlagerungsreaktionen.

Die Enolisierung der Carbonylgruppe dürfte dabei der Anfangsschritt zahlreicher Abbau- und Umlagerungsreaktionen sein. Die alkalisch katalysierte Aldose-Ketose-Isomerisierung ist unter dem Namen Lobry de Bruyn - Alberda van Ekenstein-Umlagerung[45-47] bekannt, z.B. ist die Verteilung im Falle Fructose-Glucose-Mannose in verdünnter Natronlauge[24, 33] bei 35 °C nach 100 h 28 : 3 : 57.



Neben diesen Isomerisierungsreaktionen werden Monosaccharide in alkalischer Lösung zu isomeren Säuren, meist Saccharinsäuren umgelagert. In der Kälte dauert diese Umsetzung mehrere Tage. Zunächst werden Endiolate gebildet, die eine ß-Eliminierung erleiden. Danach tautomerisiert die Zwischen-

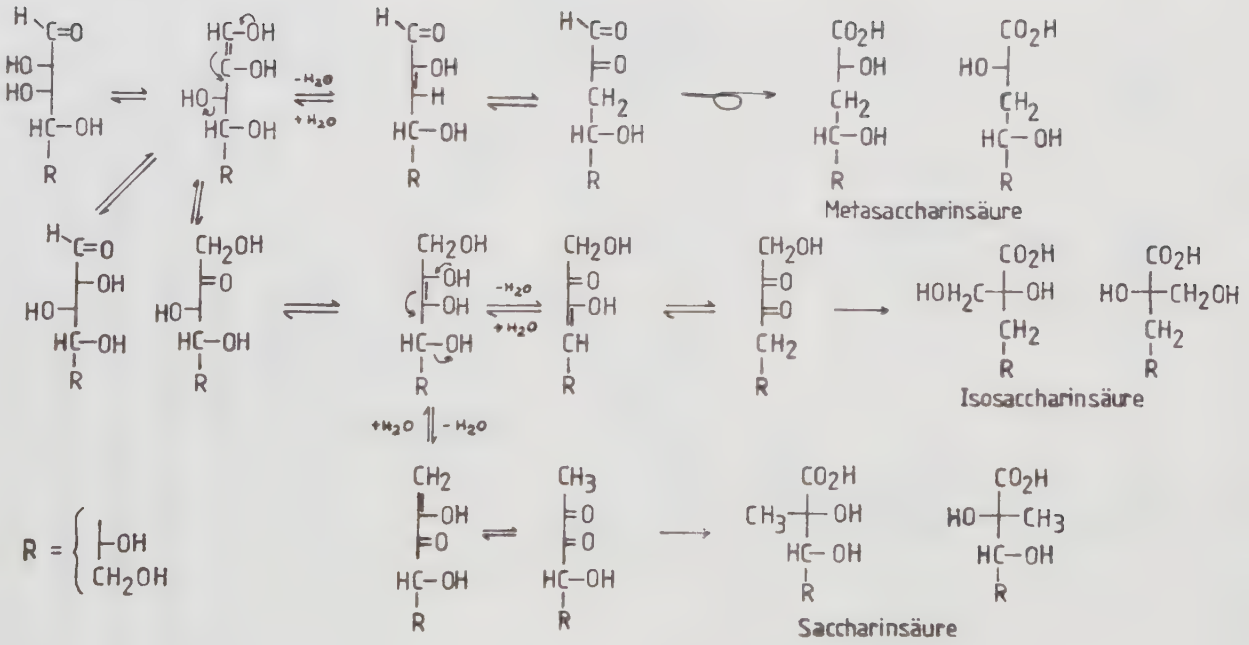


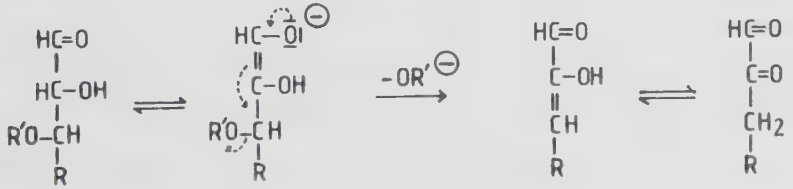
Abb. 13 : Übersichtsschema der Bildung von Saccharinsäuren

stufe zur Dicarbonylverbindung, welche anschließend den entscheidenden Schritt der Reaktionsfolge, eine Benzilsäure-Umlagerung durchläuft.

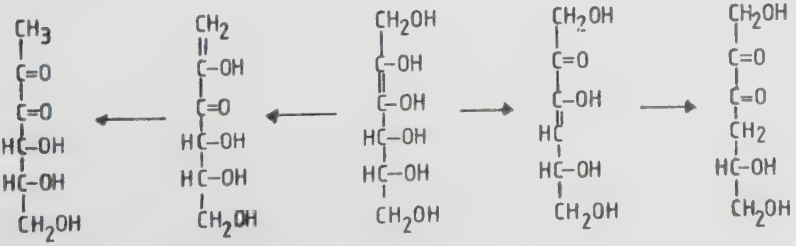
Das Reaktionsschema der Entstehung von Saccharinsäuren nach vorangegangener Endiolatbildung sowie der Lobry de Bruyn - Alberda van Ekenstein-Umlagerung, ist in Abb. 13 dargestellt.

Bei Untersuchungen über die Bildung von Saccharinsäuren hat sich ergeben[29-31], daß die Stärke und Konzentration der Basen bei diesen Reaktionen eine große Rolle spielen.
In 1%-iger Calciumhydroxidlösung werden z.B. Aldohexosen bzw. Ketohexosen in drei verschiedene Typen von Deoxyaldohexonsäure, nämlich die Metasaccharinsäure, Isosaccharinsäure und Saccharinsäure umgelagert. Die Basen-katalysierte ß-Eliminierung und die Bildung von Saccharinsäure dürfte folgendermaßen verlaufen:

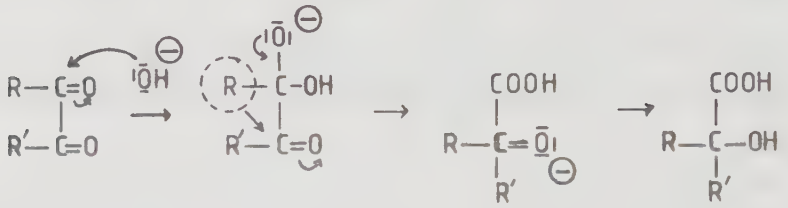
a: Aldosen



b: Ketosen

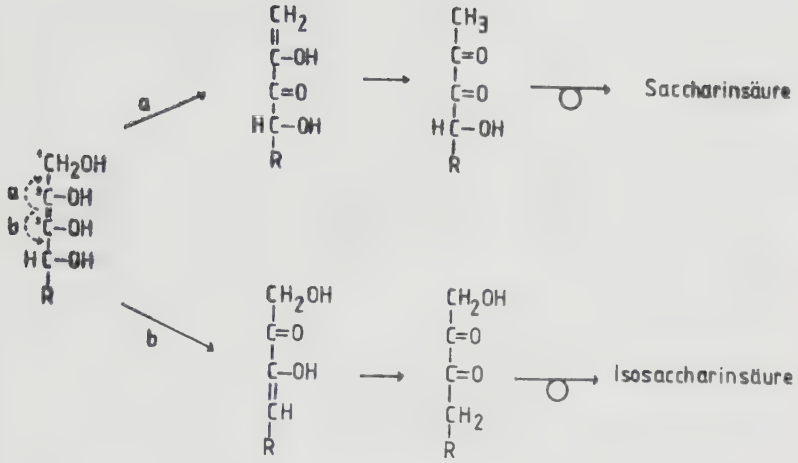


Nach NEF-ISBELL[34] erfolgt nach der Bildung des Desoxydicarbonyls eine Benzilsäure-Umlagerung, die zur Bildung von Saccharinsäure führt.



Welche Gruppe bei dieser Umlagerung wandert hängt stark von der Base ab: in Natriumhydroxid-Lösung wandert das H-Atom und in Calciumhydroxid-Lösung die Methyl-Gruppe bevorzugt[35].

Aus der ersten Reihe des Reaktionsschemas der Saccharinsäure-Bildung (Abb. 13) ist zu erkennen, daß Aldohexosen über 1,2-Endiolate und 1,2-Dicarbonyl-Komponenten mit anschließender Benzilsäure-Umlagerung in die Metasaccharinsäuren (3-Desoxy-hexonsäure) übergehen. Ketohexosen, die durch Isomerisierung von Aldohexosen entstehen, führen über die entsprechenden 2,3-Endiolate bzw. 2,3-Dicarbonyl-Komponenten zu Isosaccharinsäuren (3-Desoxy-2-hydroxymethyl-pentonsäure). In der letzten Reihe des Reaktionsschemas lagern sich die Endiolate über eine andere Zwischenstufe zu Saccharinsäuren um.

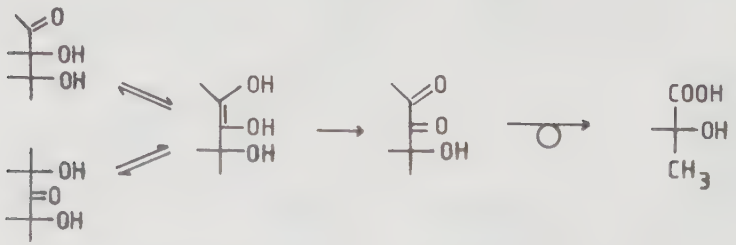


Durch Mesomeriestabilisierung kann die Doppelbindung von C (2-3)-Stellung zur C (1-2)- oder C (3-4)- Stellung verschoben werden, d.h. 2,3-Endiolate sind offensichtlich stabiler als 1,2-Endiolate, da die Isosaccharin- bzw. Saccharinsäure bevorzugt gebildet wird. Diese Annahme wird in vorliegenden Untersuchungen bestätigt.

Bei 3-O-substituierten Glucose-Derivaten[32] wird Glucometasaccharinsäure gebildet.

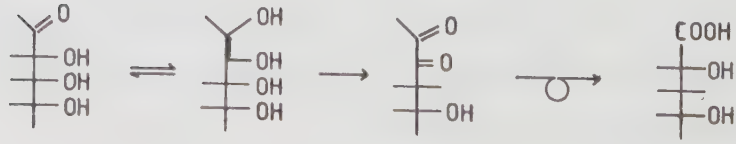
In Abb. 4 sind die möglichen Saccharinsäuren, die durch Umlagerungen gebildet werden auf der linken und rechten Seite des Übersichtsschemas abgebildet.

1. Aus Triosen (Glycerinaldehyd, Dihydroxiaceton) wird Milchsäure gebildet.



Die Bildung der Milchsäure aus Triosen läßt sich nur schwer verfolgen, da sie von Sekundärreaktionen überlagert wird.

2. Aldotetrosen (Erythrose, Threose) gehen nach der Umlagerung in eine einheitliche Metasaccharinsäure über. Aus den Abbildungen 14+15 ist zu erkennen, daß aus Erythrose bevorzugt die Tetrometasaccharinsäure entsteht, die bei 88 min eluiert wird. Die isomeren Saccharinsäuren werden aufgrund des Glycolpaares - wie erwartet - später eluiert.



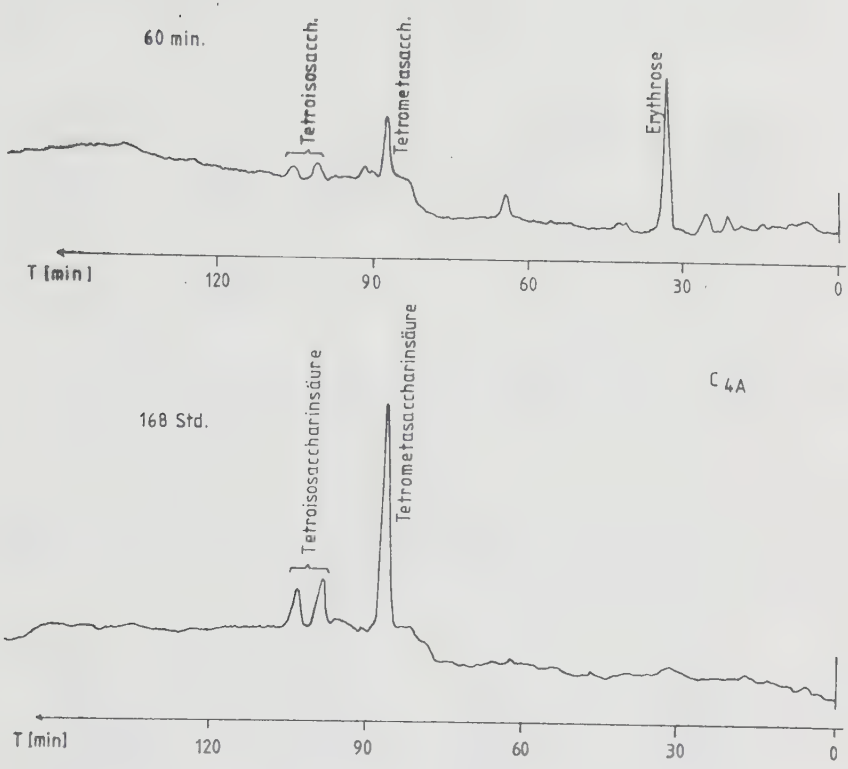
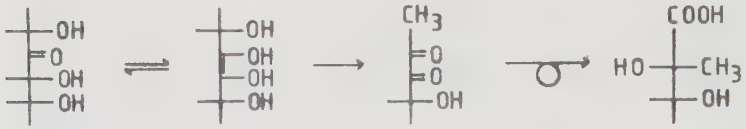
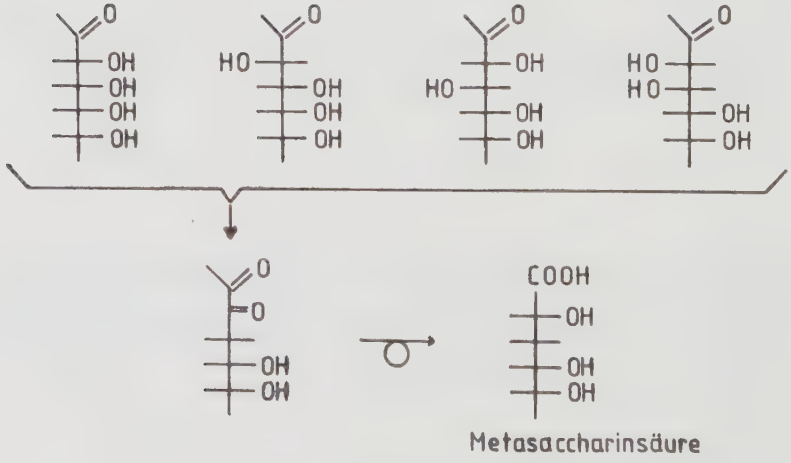


Abb. 14 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) von Erythrose in 0,01 N NaOH-Lösung nach 60 min und 168 h, bei 25 °C

3. Aus Tetrulose wird nur die entsprechende Saccharinsäure gebildet. Isosaccharinsäure entfällt also hier.



4. Aldopentosen (Ribose, Arabinose, Xylose und Lyxose) ergeben ebenfalls nur eine Form einer 1,2-Dicarbonyl-Komponente und damit wird auch nur eine Form der Pento-metasaccharinsäure gebildet (vgl. Abb.15, 17)



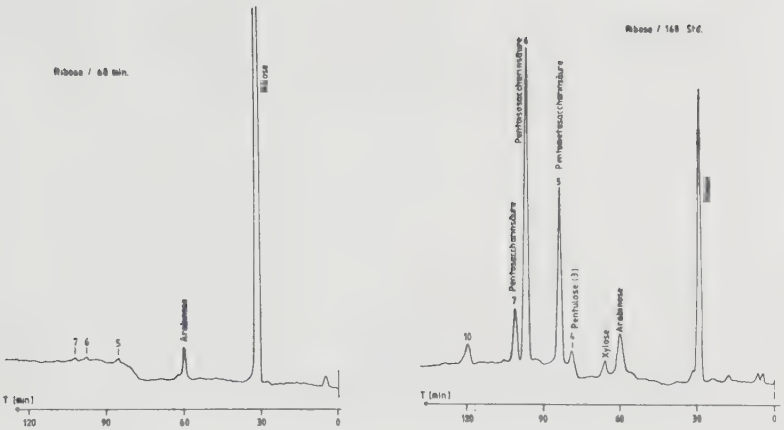


Abb. 15 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) von Ribose in 0,01 N NaOH-Lösung nach 60 min und 168 h, bei 25° C ; Peak 10 : unbekannt

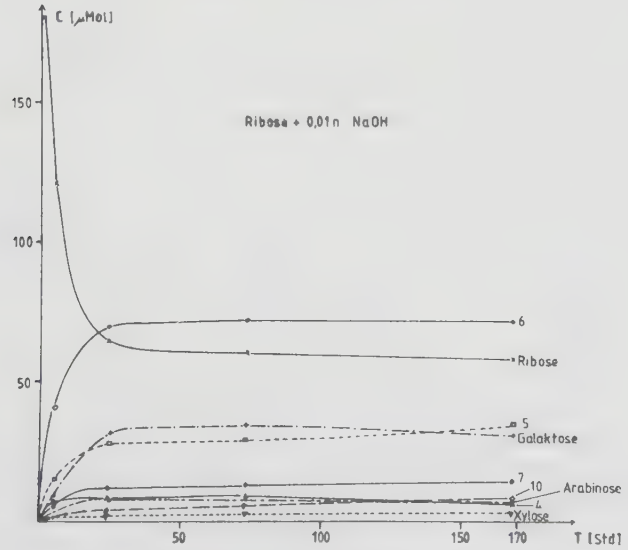


Abb. 16 : C/T-Diagramm der Produktverteilung von Ribose in 0,01 N NaOH-Lösung bei 25° C
Peak 4,5,6,7 und 10 vgl. Abb. 15

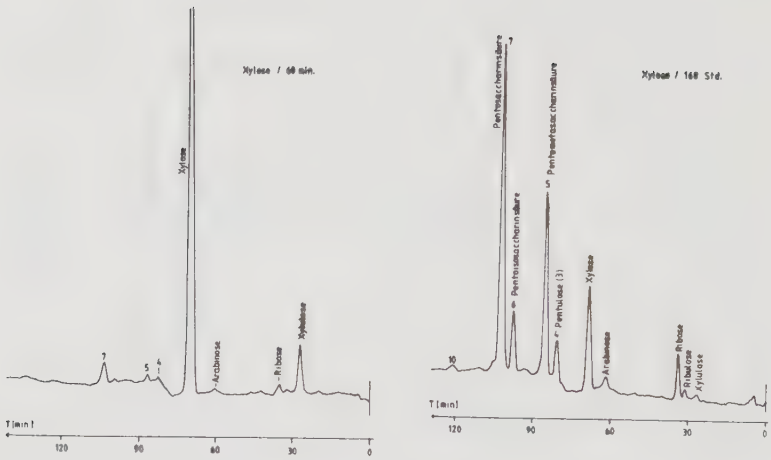


Abb. 17 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) von Xylose in 0,01 N NaOH-Lösung nach 60 min und 168 h, bei 25° C

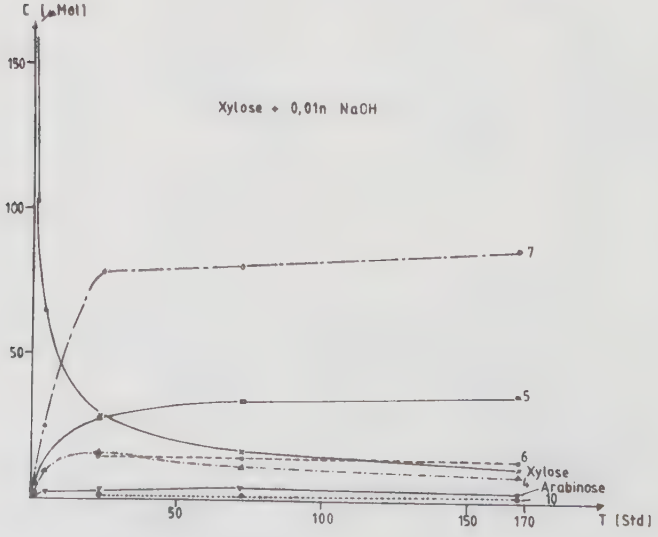


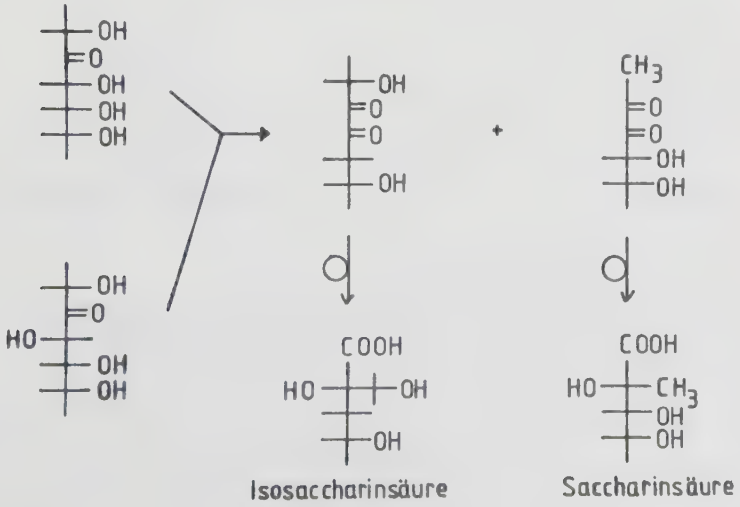
Abb. 18 : C/T-Diagramm der Produktverteilung von Xylose in 0,01 N NaOH-Lösung bei 25° C
Peak 4,5,6,7, und 10 vgl. Abb. 17

Wie aus den Abb. 15 und 17 hervorgeht, wird aus der Pentose zunächst die erwähnte Metasaccharinsäure (5) gebildet. Aus Xylose entsteht weiterhin bevorzugt die korrespondierende Saccharinsäure (7), aus Ribose die entsrechende Iso-Saccharinsäure (6).

Peak 4 dürfte ein starker Endiolatbildner, wahrscheinlich Pentulose (3) sein.

Die Abbildungen 15-18 zeigen die Kinetiken dieser Reaktionen in 0,01 N NaOH bei 25° C für Ribose und Xylose. Wie erwartet lagern die korrespondierenden Pentosen zunächst um, gehen aber dann rasch in die entsprechenden Saccharinsäuren über.

5. Bei Ketopentosen (Ribulose, Xylulose) werden sowohl die entsprechende Isosaccharinsäure als auch Saccharinsäure gebildet. Bei der Saccharinsäure entsteht überwiegend die trans-Form der OH-Gruppen (zwischen C-2 und C-3). Das Auftreten eines diastereomeren Paares wurde nicht beobachtet. (über 5% bezogen auf das Gemisch)



6. Bei Aldohexosen entstehen diastereomere Formen der 1,2-Dicarbonyl-Komponente; entscheidend ist die Lage der OH-Gruppe an C-4. Damit werden entsprechende Diastereomerenpaare von Metasaccharinsäuren gebildet, allerdings wird auch hier die alltrans-Form gegenüber der korrespondierenden cis-Form bevorzugt.

D-Glucose und D-Galaktose werden bei diesen Untersuchungen als Vertreter der beiden Spezies eingesetzt.

Die daraus resultierenden verschiedenen Saccharinsäuren sind im Reaktionsschema (Abb. 19) abgebildet.

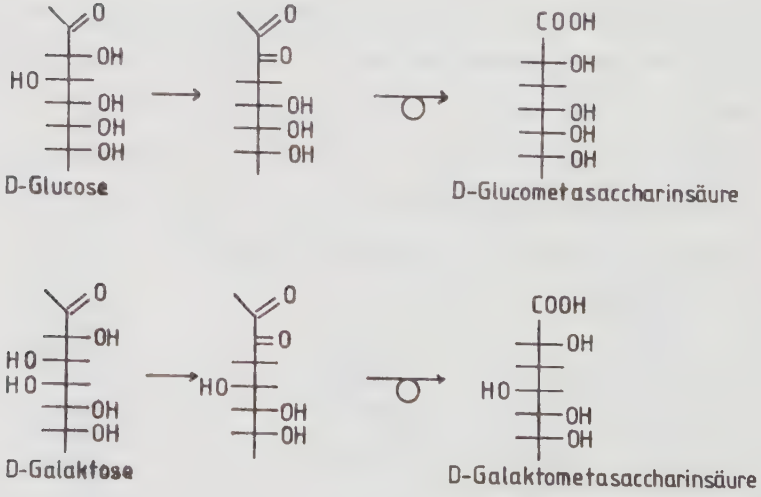


Abb. 19: Bildung der Saccharinsäuren von Aldohexosen

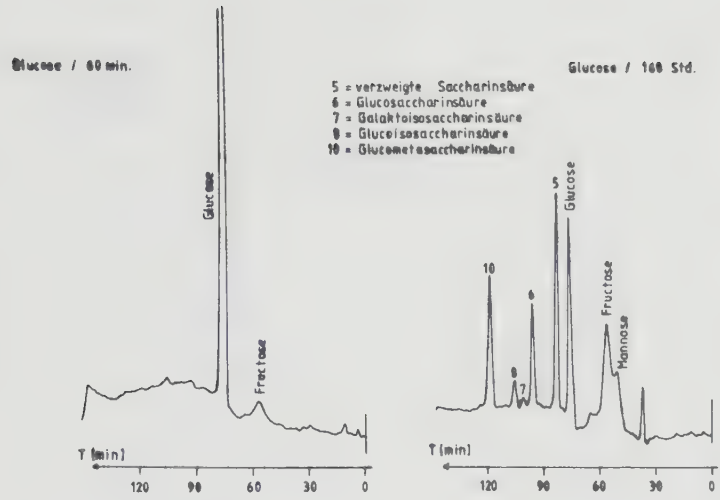


Abb. 20 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) von Glucose in 0,01 N NaOH-Lösung nach 60 min und 168 h,

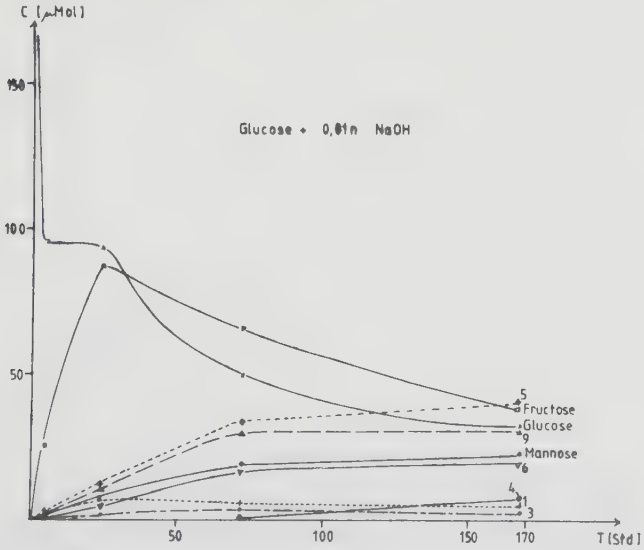


Abb. 21 : C/T-Diagramm der Produktverteilung von Glucose in 0,01 N NaOH-Lösung bei 25° C
Peak 5,6,7,8 und 10 vgl. Abb. 20

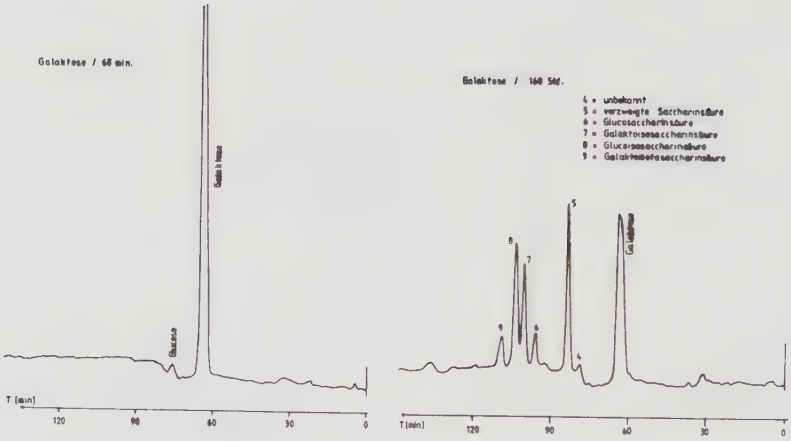


Abb.22 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) von Galaktose in 0,01 N NaOH-Lösung nach 60 min und 168 h, bei 25° C

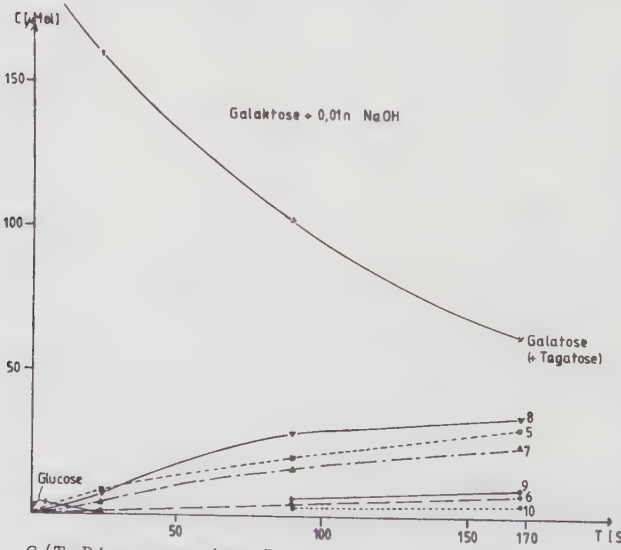


Abb.23 : C/T-Diagramm der Produktverteilung von Galaktose in 0,01 N NaOH-Lösung bei 25° C
Peak 4 bis 9 vgl. Abb. 22

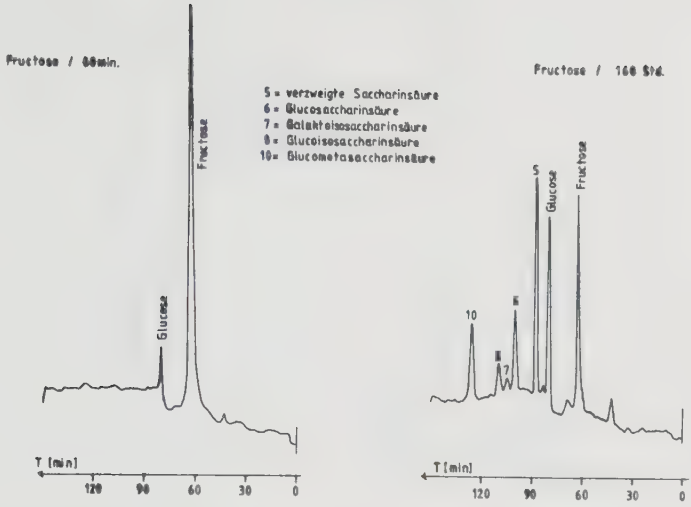


Abb.24 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) von Fructose in 0,01 N NaOH-Lösung nach 60 min und 168 h, bei 25° C

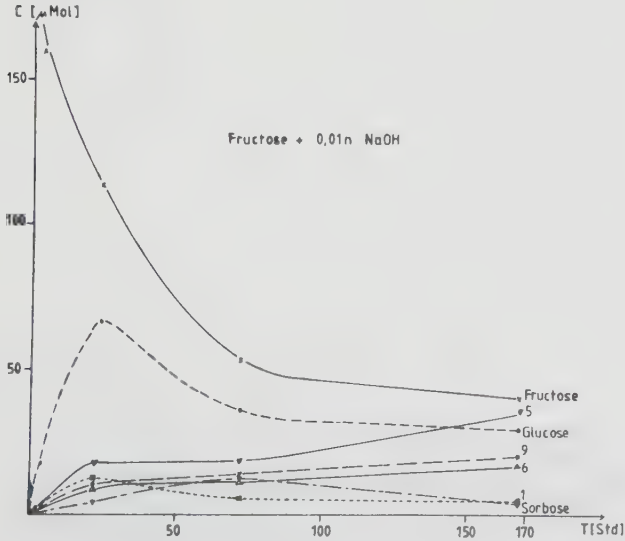


Abb.25 : C/T-Diagramm der Produktverteilung von Fructose in 0,01 N NaOH-Lösung bei 25° C
Peak 5,6,7,8 und 10 vgl. Abb. 24

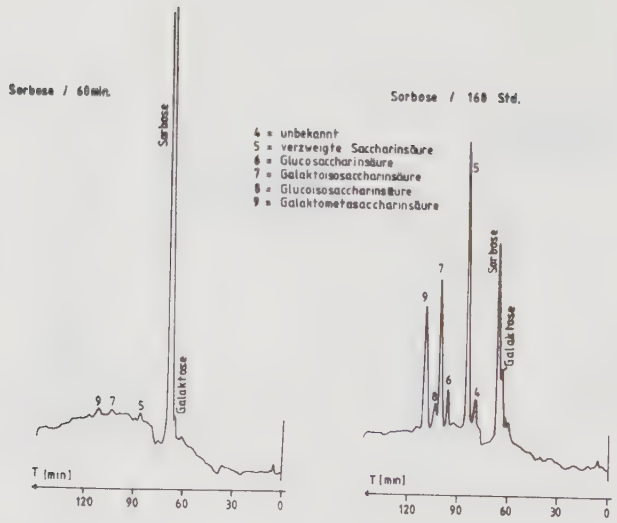


Abb. 26 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) von Sorbose in 0,01 N NaOH-Lösung nach 60 min und 168 h, bei 25° C

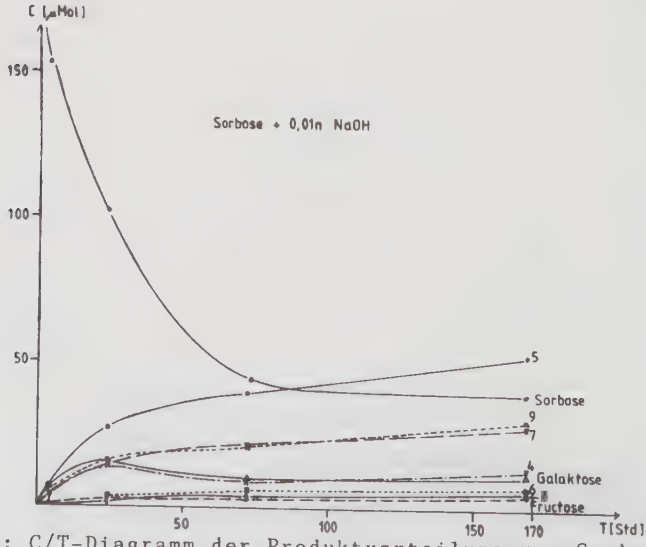
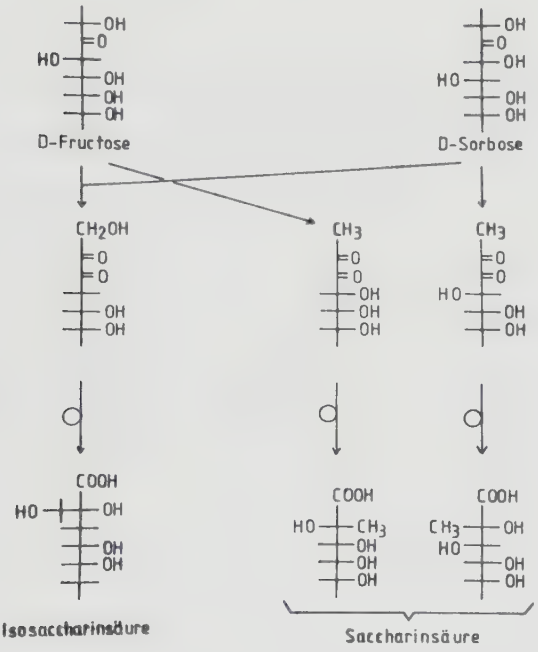


Abb.27 : C/T-Diagramm der Produktverteilung von Sorbose in 0,01 N NaOH-Lösung bei 25° C
Peak 4 bis 9 vgl. Abb. 26

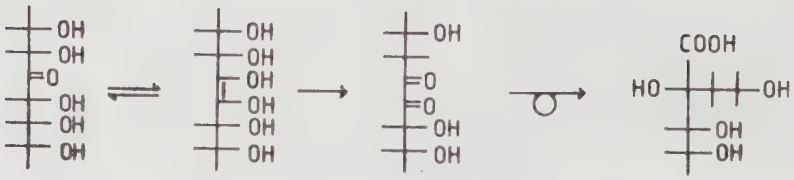
7. Analog zu den Aldohexosen werden aus Ketohexosen diastereomere Saccharinsäuren gebildet.

a) 2-Hexulosen



b) 3-Hexulosen

Durch Isomerisierung entsteht 3-Hexulose, die weiter über die 3,4-Dicarbonyl-Komponente nach der Umlagerung zu einer verzweigten Saccharinsäure führt.

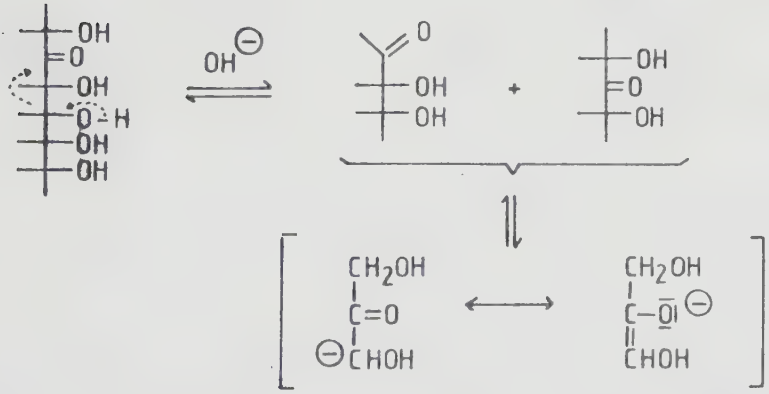


Von den erwarteten Saccharinsäuren wird bei allen möglichen Konfigurationen eine gemeinsame verzweigte Saccharinsäure gebildet, die als Peak 5 eluiert wird (vgl. Abb. 20, 22, 24, 26). Die Bildung der entsprechenden Meta- und Isosaccharinsäuren verläuft wie erwartet. Die Zuordnung erfolgte durch hergestellte Vergleichssubstanzen[29, 32, 36, 37].
Die Abbildungen 20 bis 27 zeigen die Kinetiken der Saccharinsäurebildung für vier Hexosen, sowie einige erhaltene Chromatogramme.

5. Rückspaltungsreaktionen

5.1. Rückspaltung über Endiolatbildung ohne Dicarbonyle als Zwischenstufe

Die Aldoladdition ist reversibel. Rückspaltprodukte aus z.B. Hexulose sind meistens Triosen (Glycerinaldehyd und Dihydroxiaceton). Es wurden aber auch Formaldehyd, Glykolaldehyd, Tetrosen und Folgeprodukte gefunden.



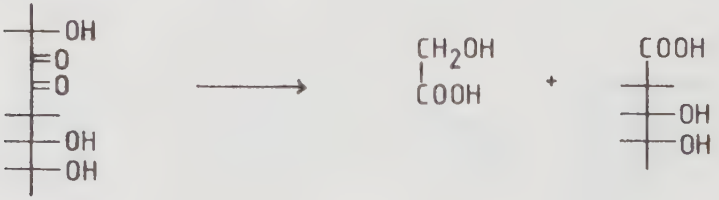
Diese gebildeten Triosen lagern sich unter anderem unter diesen Bedingungen in Milchsäure um. (vgl. Kap. 4)

5.2. Rückspaltung über Endiolatbildung mit Dicarbonylen als Zwischenstufe

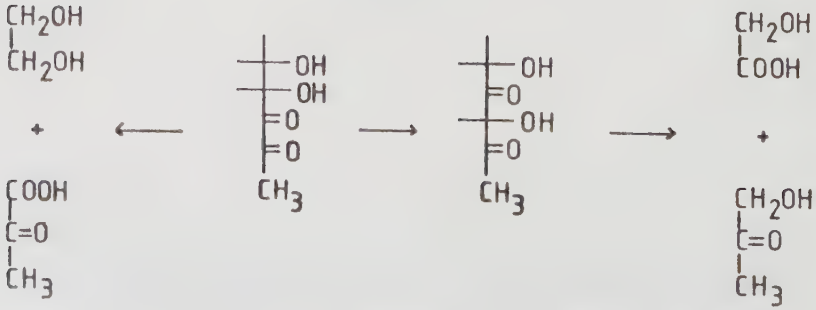
Die gebildeten 2,3-Dicarbonyle (vgl. Kap. 3) können neben der Umlagerung zu Saccharinsäuren auch Rückspaltungsreaktionen eingehen.

Aus 2,3-Dicarbonyl-Komponenten werden in geeignetm alkalischem Medium folgende Spaltprodukte erhalten:

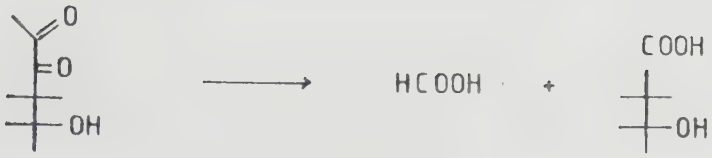
a. Hexosen



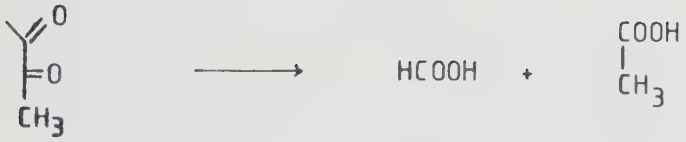
b. Pentosen



c. Tetrosen



d. Triosen



6. Gaschromatographie-Massenspektrometrie der (per)-trimethylsilylierten, hydrierten bzw. deuterierten Formose

Um Kohlenhydrate gaschromatographisch zu untersuchen müssen sie zuvor in unzersetzt verdampfbare Derivate überführt werden. Geeignet sind hierfür ihre per-methyl[52], per-acetyl[53], per-trifluoracetyl[50,51] und per-trimethylsilyl-Derivate.
Die Massenspektren der pertrimethylsilylether von Kohlenhydraten fragmentieren sehr übersichtlich und wurden deshalb für diese Untersuchungen gewählt. Da pro Zucker bis zu vier cyclische Derivate der α- und ß-anomeren der Pyranose- und Furanoseformen entstehen können, werde solche Gaschromatogramme leicht unübersichtlich und deshalb weniger geeignet, sofern komplexe Gemische, wie z.B. die Formose, untersucht werden sollen. Durch die Hydrierung der Zucker entstehen pro Aldose ein Polyalkohol, aus Ketosen zwei.
Mittels Deuterierung kann ferner der Ort der Carboxylgruppe relativ einfach festgelegt werden.
In den Tabellen 2 bis 9 sind die zu erwartenden Fragment-Ionen für Triosen, Tetrosen, Pentosen, Hexosen und Heptosen in Form ihrer zuvor hydrierten bzw. deuterierten per-Trimethylsilylderivate zusammengestellt.
Abbildung 28 zeigt das Gaschromatogramm der hydrierten und anschließend pertrimethylsilylierten Formose nach 53-minutiger Reaktionsdauer. Zu diesem Zeitpunkt zeigt die Konzentration der intermediär entstehenden " COKATALYSATOREN " ein Maximum.

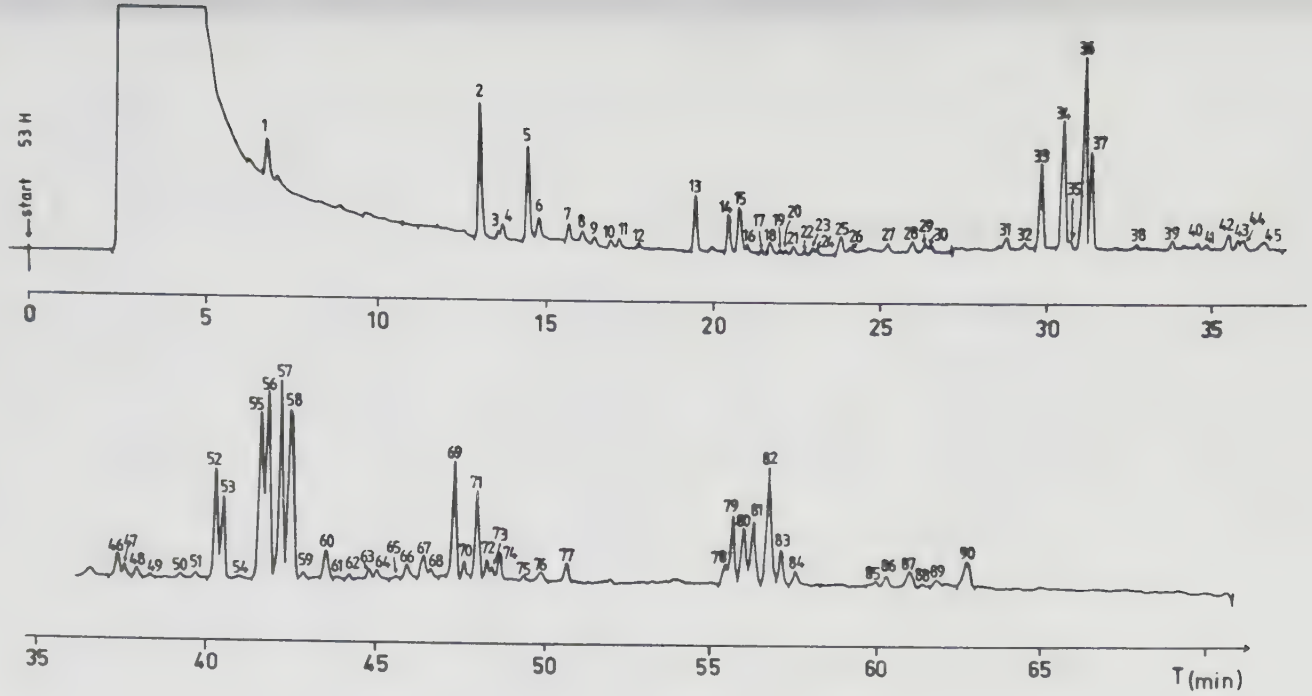
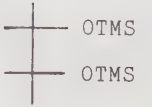


Abb. 28 : GC-Chromatogramm der hydrierten und anschließend pertrimethylsilylierten Formose nach 53-minutiger Reaktionsdauer

Säule: Durabond DB-5, 50 m x 0,25 mm i.D. / Trägergas: Wasserstoff 0,4 bar / Temperaturprogramm: T1 = 60 °C, R1 = 4 °C/min, T3 = 140 °C, R2 = 2 °C/min, T3 = 240 °C, isotherm 30 min

Detektor: FID / Probenmenge: 1 µl

Tab. 2 : Wichtigste erwartete Fragment-Ionen von per-TMS-Glycol

		D 	
m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion
-	———	207	M^+
206	M^+	-	———
-	———	192	$M^+ - CH_3$
191	$M^+ - CH_3$	-	———
-	———	117	M^+ - HOTMS
116	M^+ - HOTMS	116	M^+ - DOTMS
-	———	104	$M^+ - CH_2OTMS$
103	$M^+ - CH_2OTMS$	103	M^+ - CHDOTMS

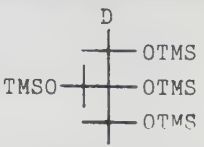
Tab. 3 : Wichtigste erwartete Fragment-Ionen von per-TMS-Glycerin

OTMS OTMS OTMS		D OTMS OTMS OTMS		OTMS D—OTMS OTMS	
m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion
-	———	309	M^+	309	M^+
308	M^+	-	———	-	———
-	———	294	$M^+ - CH_3$	294	$M^+ - CH_3$
293	$M^+ - CH_3$	-	———	-	———
-	———	219	M^+ - HOTMS	219	M^+ - HOTMS
218	M^+ - HOTMS	(218)	(M^+ - DOTMS)	(218)	(M^+ - DOTMS)
-	———	206	$M^+ - CH_2OTMS$	206	$M^+ - CH_2OTMS$
205	$M^+ - CH_2OTMS$	205	M^+ - CHDOTMS	-	———
-	———	104	CHDOTMS	-	———
103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS

Tab. 4 : Wichtigste erwartete Fragment-Ionen von per-TMS-Tetriten

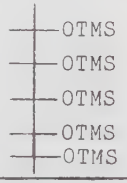
	OTMS OTMS OTMS OTMS		D OTMS OTMS OTMS OTMS		OTMS D OTMS OTMS OTMS
m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion
-	———	411	M^+	411	M^+
410	M^+	-	———	-	———
-	———	396	$M^+ - CH_3$	396	$M^+ - CH_s$
395	$M^+ - CH_3$	-	———	-	———
-	———	321	M^+ - HOTMS	321	M^+ - HOTMS
320	M^+ - HOTMS	(320)	(M^+ - DOTMS)	(320)	(M^+ - DOTMS)
-	———	308	$M^+ - CH_2OTMS$	308	$M^+ - CH_2OTMS$
307	$M^+ - CH_2OTMS$	307	M^+ - CHDOTMS	-	———
-	———	218	$M^+ - CH_2OTMS$	218	$M^+ - CH_2OTMS$
			- HOTMS		- HOTMS
217	$M^+ - CH_2OTMS$	217	M^+ - CHDOTMS	-	———
	- HOTMS		- HOTMS		
-	———	206	M^+ - CHOTMS	206	M^+ - CHOTMS
			$- CH_2OTMS$		$- CH_2OTMS$
205	M^+ - CHOTMS	205	M^+ - CHOTMS	205	M^+ - CDOTMS
	$- CH_2OTMS$		- CHDOTMS		$- CH_2OTMS$
-	———	104	CHDOTMS	-	———
103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS

Tab. 5 : Wichtigste erwartete Fragment-Ionen von verzweigten per-TMS-Tetriten

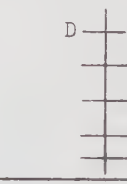


m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion
-	———	411	M^+
410	M^+	-	———
-	———	321	M^+ - HOTMS
320	M^+ - HOTMS	-	———
-	———	308	M^+ - CH_2OZMS
307	M^+ - CH_2OTMS	307	M^+ - CHDOTMS
-	———	219	M^+ - CH_2OTMS
			- OTMS
218	M^+ - CH_2OTMS	218	M^+ - CHDOTMS
	- OTMS		- OTMS
-	———	204	M^+ - CH_2OTMS
			- OTMS
			- CH_3
203	M^+ - CH_2OTMS	203	M^+ - CHDOTMS
	- OTMS		- OTMS
	- CH_3		- CH_3

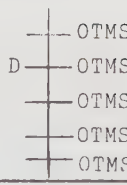
Tab. 6 : Wichtigste erwartete Fragment-Ionen von per-TMS-Pentiten



m/e	Fragment-Ion
-	———
512	M^+
-	———
497	$M^+ - CH_3$
-	———
422	M^+ - HOTMS
-	———
409	$M^+ - CH_2OTMS$
-	———
319	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
-	———
307	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
-	———
217	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
-	———
205	CHOTMS-CH_2OTMS
-	———
103	CH_2OTMS

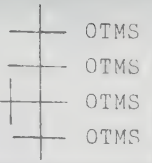


m/e	Fragment-Ion
513	M^+
-	———
498	$M^+ - CH_3$
-	———
423	M^+ - HOTMS
-	———
410	$M^+ - CH_2OTMS$
409	M^+ - CHDOTMS
320	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
319	M^+ - CHDOTMS - HOTMS
308	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
307	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS
218	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
217	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS - HOTMS
206	CHOTMS - CDHOTMS
205	CHOTMS - CH_2OTMS
104	CDHOTMS
103	CH_2OTMS

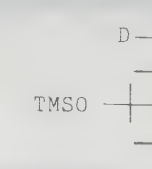


m/e	Fragment-Ion
513	M^+
-	———
498	$M^+ - CH_3$
-	———
423	M^+ - HOTMS
-	———
410	$M^+ - CH_2OTMS$
-	———
320	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
-	———
308	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
307	M^+ - CDOTMS - CH_2OTMS
218	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
217	M^+ - CDOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
206	CDOTMS - CH_2OTMS
205	CHOTMS - CH_2OTMS
-	———
103	CH_2OTMS

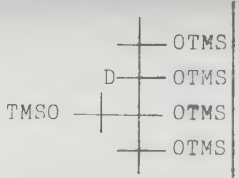
m/e	Fragment-Ion
513	M^+
-	———
498	$M^+ - CH_3$
423	M^+ - HOTMS
-	———
410	$M^+ - CH_2OTMS$
-	———
320	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
-	———
308	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
-	———
218	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
-	———
-	———
205	CHOTMS - CH_2OTMS
-	———
103	CH_2OTMS



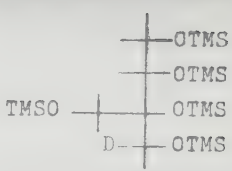
m/e	Fragment-Ion
-	———
512	M^+
-	———
497	$M^+ - CH_3$
-	———
422	M^+ - HOTMS
-	———
409	$M^+ - CH_2OTMS$
-	———
319	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
-	———
307	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
-	———
217	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
-	———
205	CHOTMS - CH_2OTMS
103	CH_2OTMS



m/e	Fragment-Ion
513	M^+
-	———
498	$M^+ - CH_3$
-	———
423	M^+ - HOTMS
-	———
410	$M^+ - CH_2OTMS$
409	M^+ - CDHOTMS
320	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
319	M^+ - CHDOTMS - HOTMS
-	———
307	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS
-	———
217	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS - HOTMS
206	CHOTMS - CHDOTMS
-	———
104	CHDOTMS
103	CH_2OTMS

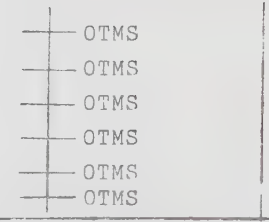


m/e	Fragment-Ion
513	M^+
-	———
498	$M^+ - CH_3$
-	———
423	M^+ - HOTMS
-	———
410	$M^+ - CH_2OTMS$
-	———
320	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
319	M^+ - CHDOTMS - HOTMS
-	———
307	M^+ - CDOTMS - DH_2OTMS
-	———
217	M^+ - CDOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
-	———
206	CDOTMS - CH_2OTMS
-	———
-	———
103	CH_2OTMS

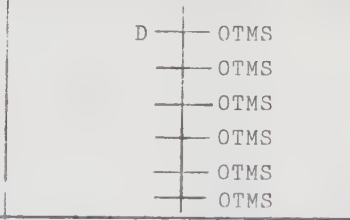


m/e	Fragment-Ion
513	M^+
-	———
498	$M^+ - CH_3$
-	———
423	M^+ - HOTMS
-	———
410	$M^+ - CH_2OTMS$
409	M^+ - CDHOTMS
320	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
319	M^+ - CHDOTMS - HOTMS
308	M^+ - CHOTMS
-	———
218	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
-	———
-	———
205	CHOTMS - CH_2OTMS
104	CHDOTMS
103	CH_2OTMS

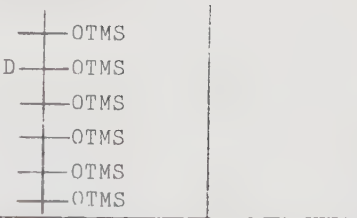
Tab. 4: Wichtigste erwartete Fragment-Ionen von per-TMS-Hexiten



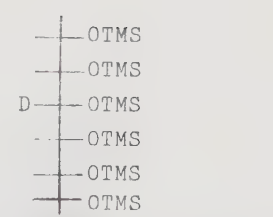
m/e	Fragment-Ion
-	———
614	M^+
-	———
599	$M^+ - CH_3$
-	———
524	M^+ - HOTMS
-	———
511	$M^+ - CH_2OTMS$
-	———
421	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
-	———
-	———
-	———
319	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
-	———



m/e	Fragment-Ion
615	M^+
-	———
600	$M^+ - CH_3$
-	———
525	M^+ - HOTMS
-	———
512	$M^+ - CH_2OTMS$
511	M^+ - CHDOTMS
422	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
421	M^+ - CHDOTMS - HOTMS
410	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
409	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS
320	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
319	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS - HOTMS
308	$M^+ - (CHOTMS_2$ - CH_2OTMS



m/e	Fragment-Ion
615	M^+
-	———
600	$M^+ - CH_3$
-	———
525	M^+ - HOTMS
-	———
512	$M^+ - CH_2OTMS$
-	———
422	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
-	———
410	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
409	M^+ - CDOTMS - CH_2OTMS
320	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
319	M^+ - CDOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
308	$M^+ - (CHOTMS_2$ - CH_2OTMS



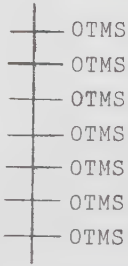
m/e	Fragment-Ion
615	M^+
-	———
600	$M^+ - CH_3$
-	———
525	M^+ - HOTMS
-	———
512	$M^+ - CH_2OTMS$
-	———
422	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
-	———
410	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
-	———
320	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
-	———
308	M^+ - (CHOTMS)

CH_2OTMS

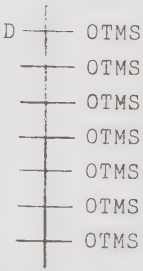
Fortsetzung von Tab. 8

m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion
307	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS	307	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CHDOTMS	307	M^+ - CHOTMS - CDOTMS - CH_2OTMS	307	M^+ - CDOTMS - CHOTMS - CH_2OTMS
-	———	218	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS	218	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS	218	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS
217	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS	217	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CHDOTMS - HOTMS	217	M^+ - CHOTMS - CDOTMS - CH_2OTMS	217	M^+ - CDOTMS - CHOTMS - CH_2OTMS
-	———	206	CHOTMS - CHDOTMS	206	CDOTMS - CH_2OTMS	-	———
205	CHOTMS - CH_2OTMS	205	CHOTMS - CH_2OTMS	205	CHOTMS - CH_2OTMS	205	CHOTMS - CH_2OTMS
-	———	104	CHDOTMS	-	———	-	———
103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS

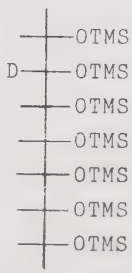
Tab. 9 : Wichtigste erwartete Fragment-Ionen von per-TMS-Heptiten



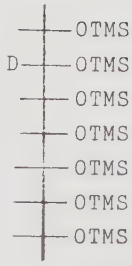
m/e	Fragment-Ion
-	———
716	M^+
-	———
626	M^+ - HOTMS
-	———
613	M^+ - CH_2OTMS
-	———
523	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS
-	———
511	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
448	-
447	M^+ - $(HOTMS)_2$ - OTMS
-	———
421	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS



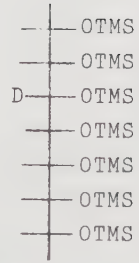
m/e	Fragment-Ion
717	M^+
-	———
627	M^+ - HOTMS
-	———
614	M^+ - CH_2OTMS
613	M^+ - CHDOTMS
524	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS
523	M^+ - CHDOTMS - HOTMS
512	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
511	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS
448	M^+ - $(HOTMS)_2$ - OTMS
-	———
422	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
421	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS



m/e	Fragment-Ion
717	M^+
-	———
627	M^+ - HOTMS
-	———
614	M^+ - CH_2OTMS
-	———
524	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS
-	———
512	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
511	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS
448	M^+ - $(HOTMS)_2$ - OTMS
-	———
422	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
421	M^+ - CHOTMS - CHDOTMS



m/e	Fragment-Ion
717	M^+
-	———
627	M^+ - HOTMS
-	———
614	M^+ - CH_2OTMS
-	———
524	M^+ - CH_2OTMS HOTMS
-	———
512	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
-	———
448	M^+ -$(HOTMS)_2$ - OTMS
-	———
422	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
-	———



m/e	Fragment-Ion
717	M^+
-	———
627	M^+ - HOTMS
-	———
614	M^+ - CH_2OTMS
-	———
524	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS
-	———
512	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS
-	———
448	M^+ - $(HOTMS)_2$ - OTMS
-	———
422	M^+ - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS
-	———

m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion	m/e	Fragment-Ion
-	———	410	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS	410	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS	410	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS	410	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS
409	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS	409	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CHDOTMS	409	M^+ - CHOTMS - CDOTMS - CH_2OTMS	409	M^+ - CDOTMS - CHOTMS - CH_2OTMS	-	———
-	———	358	m/e448 - HOTMS	358	m/e448 - HOTMS	358	m/e448 - HOTMS	358	m/e448 - HOTMS
357	m/e 447 -HOTMS	-	———	-	———	-	———	-	———
-	———	320	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS	320	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS	320	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS	320	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS
319	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS	319	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CHDOTMS - HOTMS	319	M^+ - CHOTMS - CDOTMS - CH_2OTMS - HOTMS	319	M^+ - CDOTMS - CHOTMS - CH_2OTMS - HOTMS	-	———
-	———	308	M^+ - $(CHOTMS)_3$ - CH_2OTMS	308	M^+ - $(CHOTMS)_3$ - CH_2OTMS	308	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS	-	———
307	M^+ - $(CHOTMS)_3$ - CH_2OTMS	307	M^+ - $(CHOTMS)_3$ - CHDOTMS	307	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CDOTMS - CH_2OTMS	307	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CDOTMS - CH_2OTMS	307	M^+ - CDOTMS - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS
-	———	218	M^+ - $(CHOTMS)_3$ - CH_2OTMS - HOTMS	218	M^+ - $(CHOTMS)_3$ - CH_2OTMS - HOTMS	218	M^+ - $(CHOTMS)_3$ - CH_2OTMS - HOTMS	-	———
217	M^+ - $(CHOTMS)_3$ - CH_2OTMS - HOTMS	217	M^+ - $(CHOTMS)_3$ - CHDOTMS - HOTMS	217	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CDOTMS - CH_2OTMS - HOTMS	217	M^+ - $(CHOTMS)_2$ - CDOTMS - CH_2OTMS - HOTMS	217	M^+ - CDOTMS - $(CHOTMS)_2$ - CH_2OTMS - HOTMS
-	———	206	CHOTMS - CDHOTMS	206	CDOTMS - CH_2OTMS	-	———	-	———
205	CHOTMS - CH_2OTMS	205	CHOTMS - CH_2OTMS	205	CHOTMS - CH_2OTMS	205	CHOTMS - CH_2OTMS	205	CHOTMS - CH_2OTMS
-	———	104	CDHOTMS	-	———	-	———	-	———
103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS	103	CH_2OTMS

Von den einzelnen Peaks wurden, soweit möglich mittels der gekoppelten GC-MS Massenspektren aufgenommen. Dieses wurde mit einer deuterierten Form der Formose wiederholt, um weitere Informationen zu erhalten.

Zuordnung der Peaks der Gaschromatogramme der hydrierten/ deuterierten per-Trimethylsylil-Formose

Peak 1 Glycol

Peak 2 Glycerin (vgl. Abb. 29 ung Tab. 3)

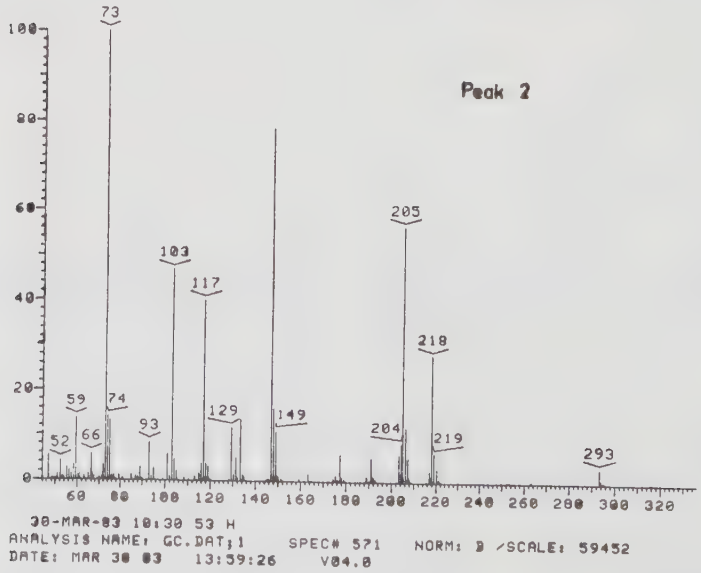


Abb. 29 : Massenspektrum von Peak 2

Peak 3 2-Desoxy-tetrosaccharinsäure, Folgeprodukt der Rückspaltung einer 1,2-Dicarbonyl-3-desoxy-Verbindung (vgl. Kap. 4, s. 26 und Abb. 30)

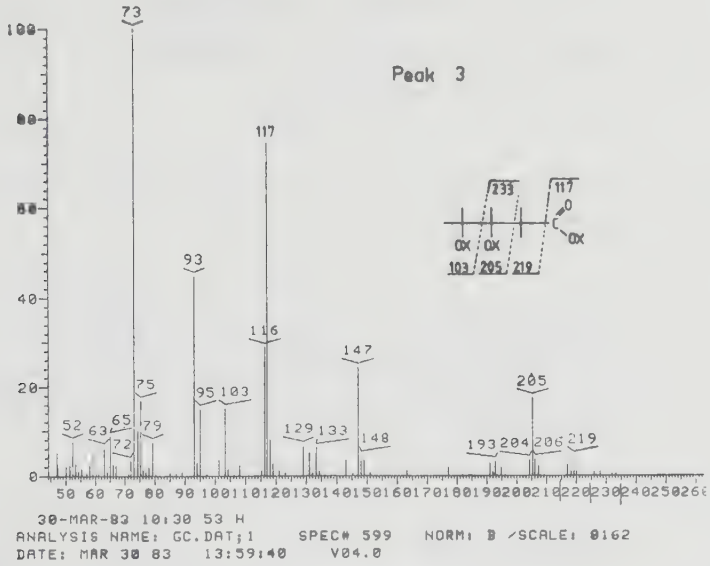


Abb. 30 : Massenspektrum von Peak 3

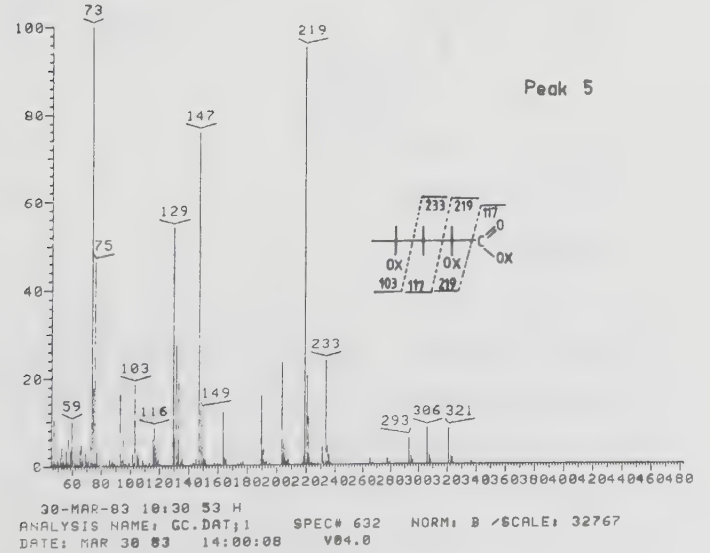


Abb. 31 : Massenspektrum von Peak 5

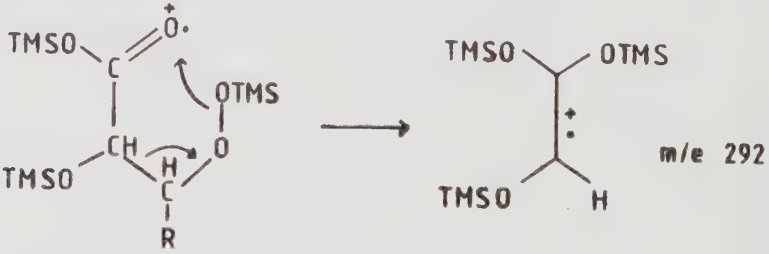
Peak 4 Tetrosaccharinsäure? (Intensität sehr gering!)

Peak 5 Tetrometasaccharinsäure (vgl. Abb. 31 und Kap. 4, s. 28

Peak 6 2-Desoxy-pentonsäure, Folgeprodukt einer Rückspaltung einer 2-Keto-3-desoxy-aldopentose.
Vgl. Abb. 32 und Tab. 11

Tab. 11 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 6

m/e	Fragment-Ion
321	M^+ - COOTMS
307	C-3 Fragment
292	McLafferty-Umlagerungsprodukt



233	COOTMS - COTMS - CH_3
219	COOTMS - CHOTMS
205	CH_2OTMS - CHOTMS

Peak 7 nicht auswertbar, da Intensität des Massenspektrums zu gering, jedoch nicht reduzierend.

Peak 8 Tetrosaccharinsäure, vgl. Kap. 4, s. 26 und Abb. 33

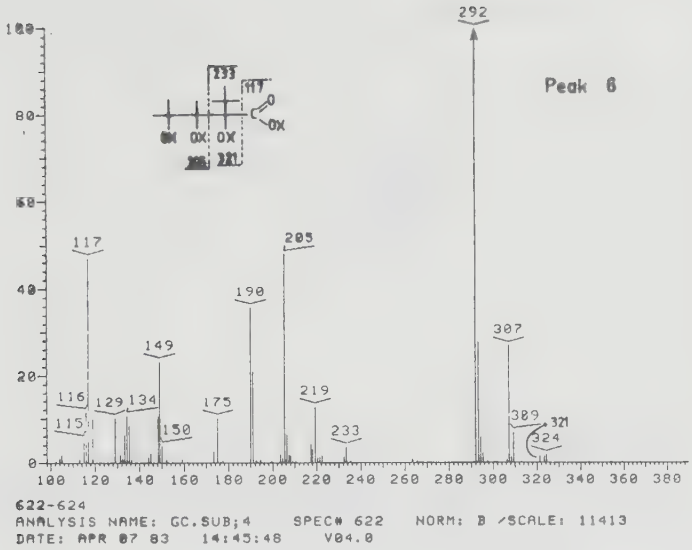


Abb. 32 : Massenspektrum von Peak 6

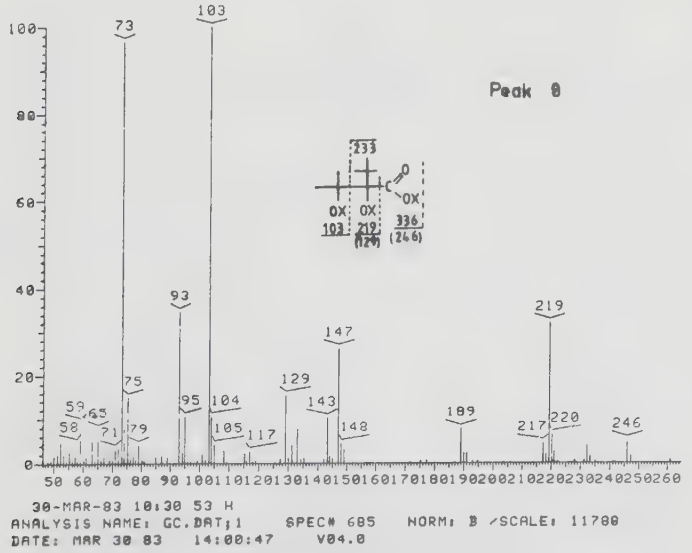


Abb. 33 : Massenspektrum von Peak 8

Peak 9 bis 12 nicht auswertbar, da Intensität zu gering.

Peak 13 2-Hydroxymethyl-glycerin, vgl. Tab. 5, s. 47

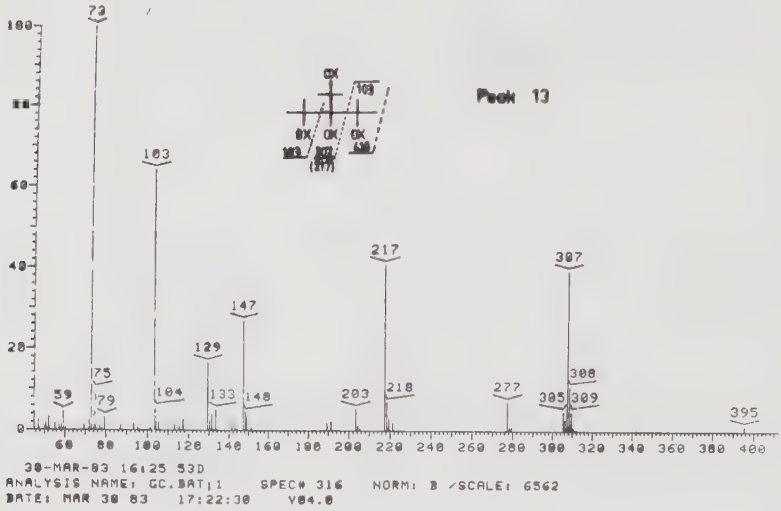


Abb. 34 : Massenspektrum von Peak 13

Peak 14 Threit, vgl. Tab. 4, s. 46

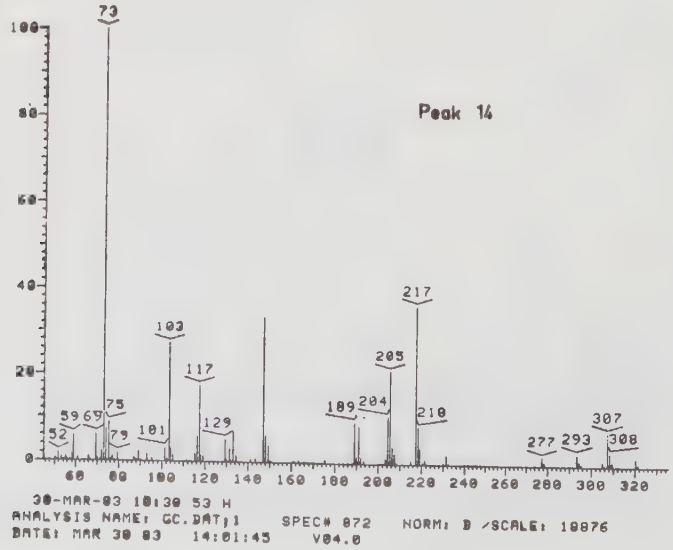


Abb. 35 : Massenspektrum von Peak 14

Peak 15 Erythrit, vgl. Tab. 4

Der Anteil an Tetrulose ist sehr gering, da m/e 307/8 im deuterierten Spektrum nahezu 1 : 1 ist. Die entstandenen Tetrulosen reagieren offenbar sofort weiter zu höheren Zuckern.

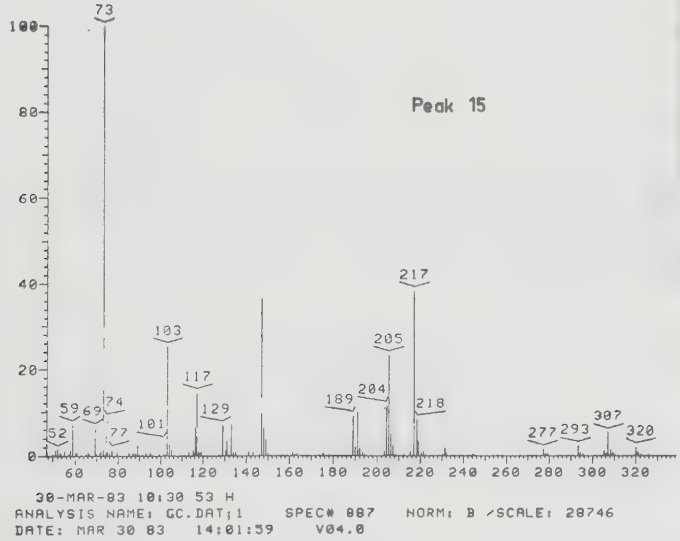


Abb. 36 : Massenspektrum von Peak 15

Peak 16 2-Desoxy-3-hydroxymethyltetronsäure, Folgeprodukt einer Rückspaltung einer 2-Keto-3-desoxy-4-hydroxymethyl-aldopentose (vgl. Abb. 37 und Fragmentierungsschema).

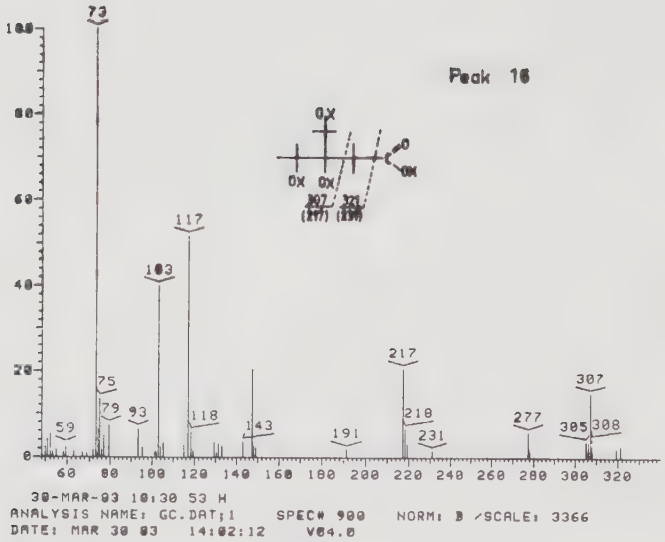
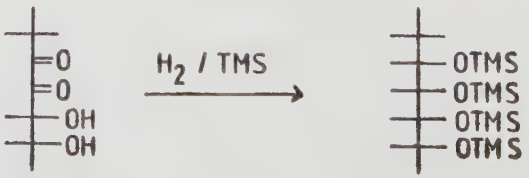


Abb. 37 : Massenspektrum von Peak 16

Peak 17 Massenspektrum nicht auswertbar, da Intensität zu gering

Peak 18 1-Desoxy-pentit, Folgeprodukt einer 1-Desoxy-3-keto-pentulose (2), vgl. Abb. 38 und Tab. 14



Tab. 14 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 18

m/e	Fragment-Ion
334	M^+ - HOTMS
319	M^+ - CH_3 - HOTMS
307	C-3 Fragment
219	CH_2 - $(CHOTMS)_2$
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS
204	$(CH_2OTMS)_2$

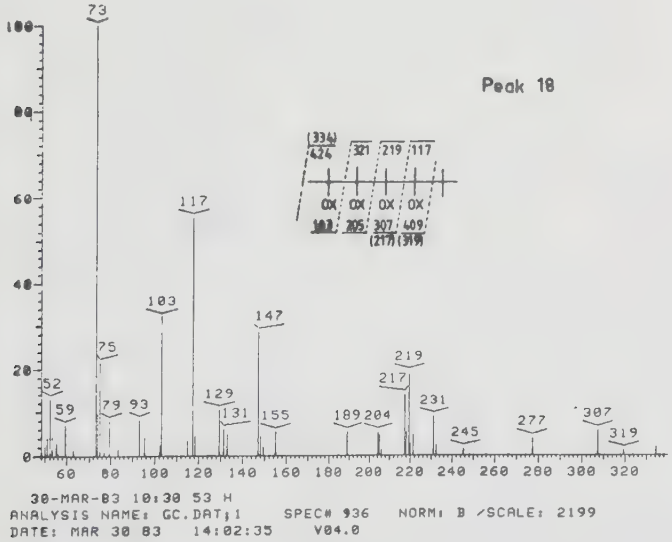


Abb. 38 : Massenspektrum von Peak 18

Peak 19 wahrscheinlich ein 2-Desoxy-pentit, das einen linearen Glycyl-Rest trägt.

Peak 20 bis 24 nicht auswertbar, da Intensität der Massenspektren zu gering.

Peak 25 Pentosaccharinsäure, vgl. Fragmentierungsschema in Abb. 39

Tab. 15 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 25

m/e	Fragment-Ion
423	$M^+ - CH_3$
321	M^+ - COOTMS
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb. 116)
234	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb. 116)
231	m/e 321 - HOTMS
205	CH_2OTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

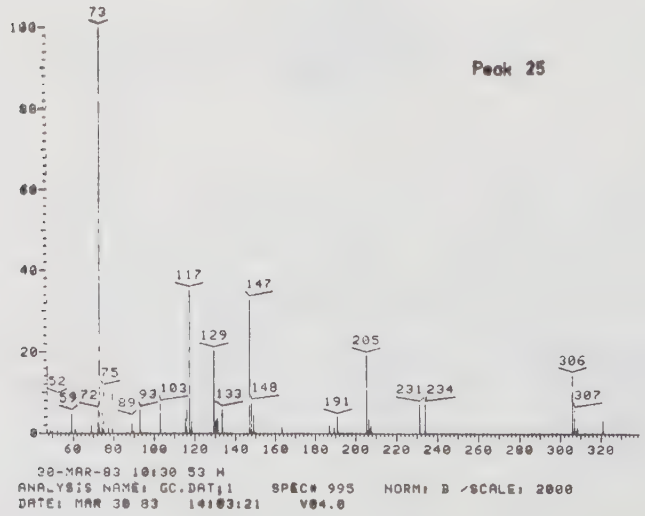


Abb. 39 : Massenspektrum von Peak 25

Peak 26 bis 28 nicht auswertbar, da Intensität der Massenspektren zu gering.

Peak 29 Pentosaccharinsäurelacton, vgl. Tab. 16 und Abb. 40

Tab. 16 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 29

m/e	Fragment-Ion
378	M^+
335	$M^+ - CO - CH_3$
288	M^+ - HOTMS
273	M^+ - HOTMS - CH_3
260	$M^+ - CH_2OTMS - CH_3$
217	C-3 Fragment
203	CHOTMS - COTMS

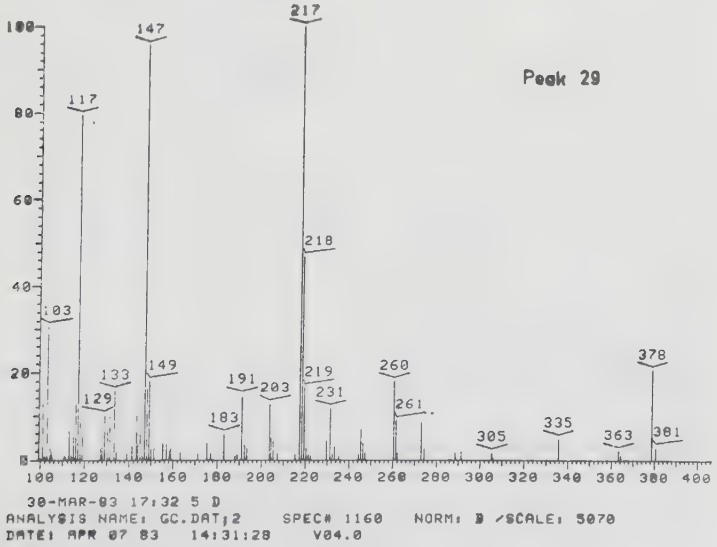


Abb. 40 : Massenspektrum von Peak 29

Peak 30 3-Desoxy-pentit, Folgeprodukt einer 3-Desoxy-2-keto-aldopentose, vgl. Tab. 17 und Abb. 41.

Tab. 17 : Interpretation der wichtigsten Fragmentionen von Peak 30

m/e	Fragment-Ion
321/2/3	M^+ - CH_2OTMS (CHDOTMS)
231/2/3	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS (bzw. deutero)
219/21	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS (bzw. deutero)
205/6/7	CH_2OTMS - CHOTMS (bzw. deutero)
129/31	m/e 219/21 - HOTMS
103/4	CH_2OTMS bzw. CHDOTMS

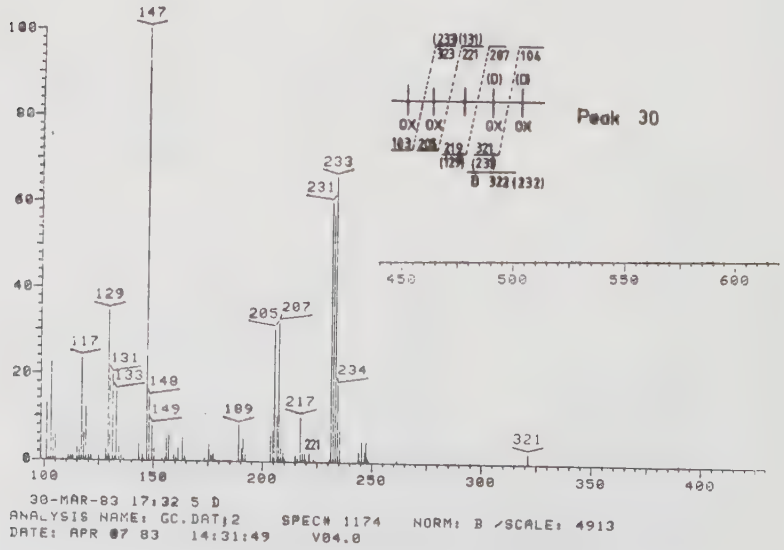


Abb. 41 : Massenspektrum von Peak 30

Peak 31 Intensität des Massenspektrums zu gering.

Peak 32 Hexosaccharinsäurelacton, vgl. Tab. 18 und Abb. 42

Tab. 18 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 32

m/e	Fragment-Ion
378	M^+
363	$M^+ - CH_3$
273	$M^+ - HOTMS - CH_3$
260	$M^+ - CH_3 - CH_2OTMS$
245	$M^+ - CH_3 - CH_2OTMS - CO$
217	C-3 Fragment
203	CHOTMS - COTMS
103	CH_2OTMS

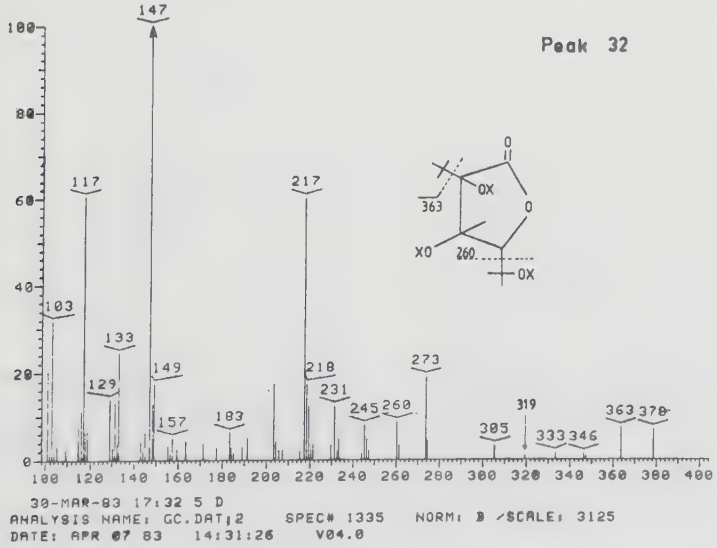


Abb. 42 : Massenspektrum von Peak 32

Peak 33 2-Hydroximethyl-tetrit, vgl. Tab. 19 und Abb. 43

Tab. 19 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 33

m/e	Fragment-Ion
497	$M^+ - CH_3$
407	$M^+ - HOTMS - CH_3$
319	$M^+ - CH_3OTMS - HOTMS$
307	$M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS$
217	C-3 Fragment
205	$CH_2OTMS - CHOTMS$

Das Fehlen der Masse 204 deutet auf eine Verzweigung hin. Das typische Fragmentierungsverhalten für Pentite spricht für einen verzweigten Pentit.

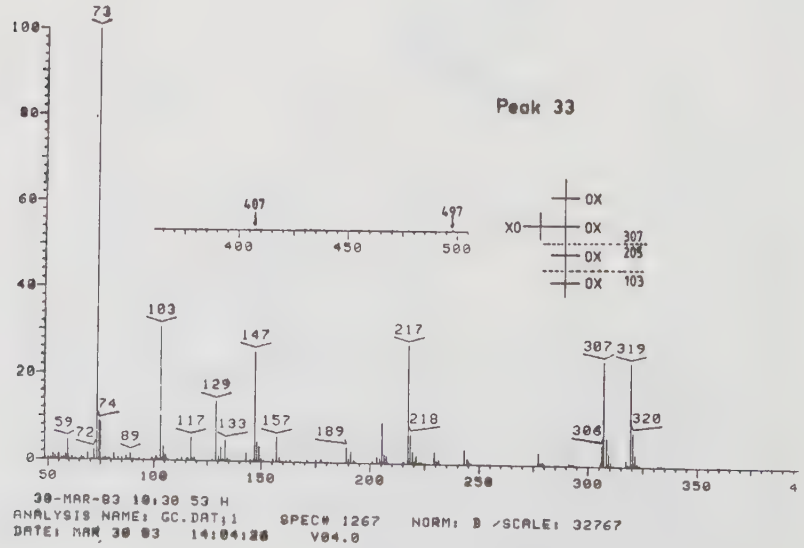


Abb. 43 : Massenspektrum von Peak 33

Peak 34 Xylit

Die Fragmentierungsschemata der Massenspektren der hydrierten und deuterierten Fraktion sind typisch für die nicht verzweigten Polyalkohole (vgl. Tab. 4). Das Auftreten der Masse m/e 319 und 320 (vgl. Abb. 44 und 44 a) spricht für ein Derivat einer Aldopentose.

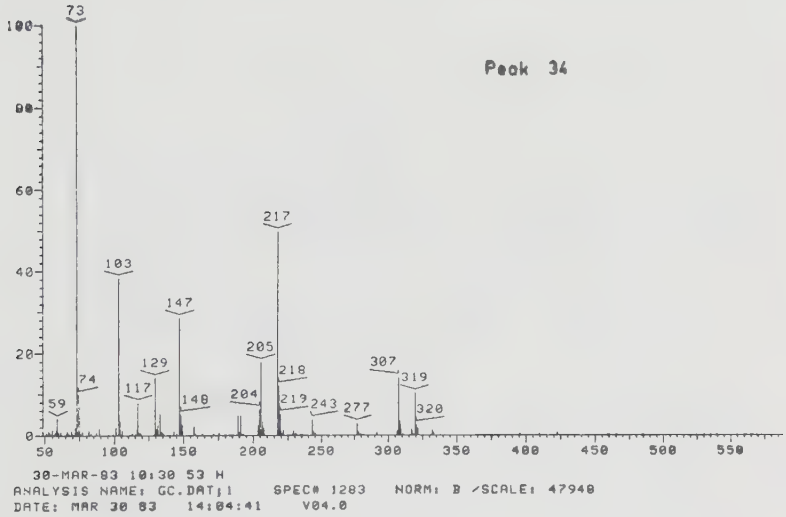


Abb. 44 : Massenspektrum von Peak 34

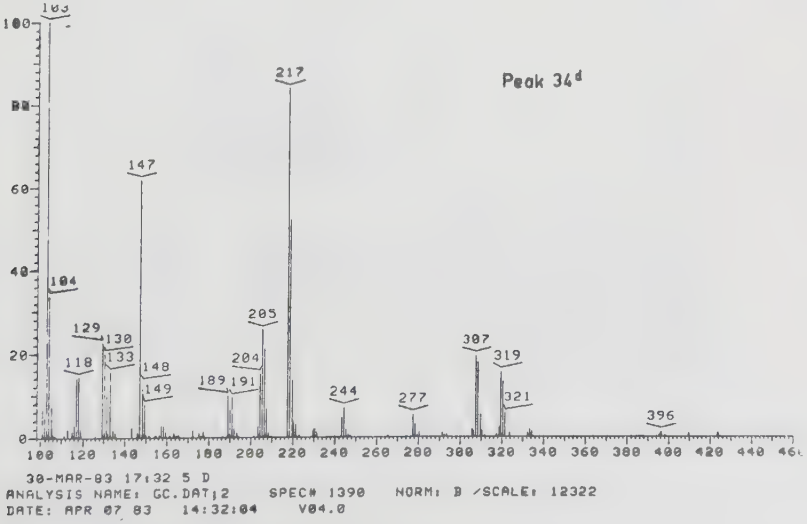


Abb. 44 a : Massenspektrum von Peak 34 d (d = deuteriert)

Peak 35 3-Desoxy-hexit, wahrscheinlich Folgeprodukt einer 2-Keto-3-desoxy-aldohexose, vgl. Tab. 20 und Abb. 45

Tab. 20 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 35

m/e	Fragment-Ion
423/4/5	M^+ - CH_2OTMS bzw. CDHOTMS
333/4/5	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS bzw. deutero
307	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS bzw. deutero
243/4/5	M^+ - CH_2OTMS - 2 HOTMS bzw. deutero
217	C-3 Fragment
205/7	CH_2OTMS - CHOTMS bzw. CHDOTMS - CDOTMS

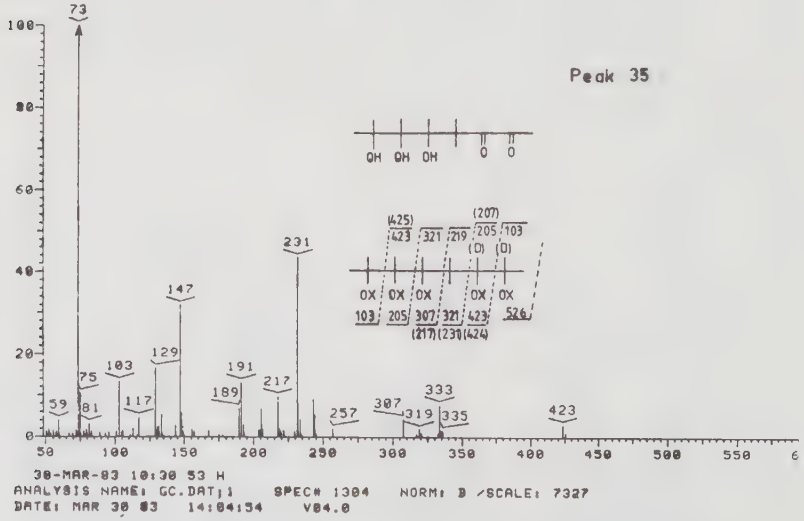


Abb. 45 : Massenspektrum von Peak 35

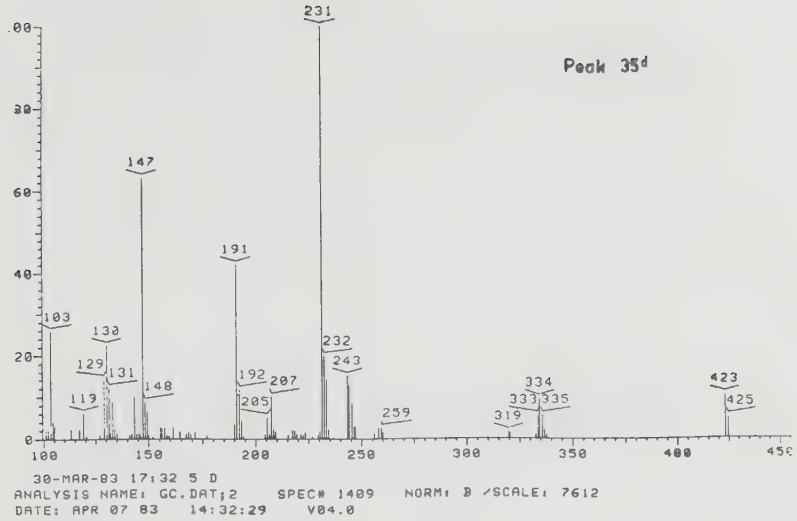


Abb. 45 a : Massenspektrum von Peak 35 d (d = deuteriert)

Peak 36 Arabit

Aufgrund der gaschromatographischen Daten sowie der erhaltenen Massenspektren handelt es sich hier um Arabit (vgl. Tab. 4). Das Auftreten der Masse 409 bestätigt dieses auch.

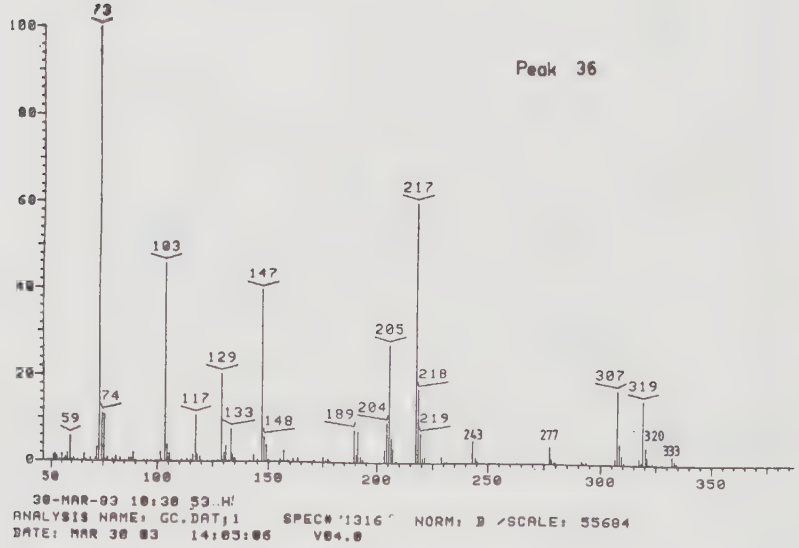
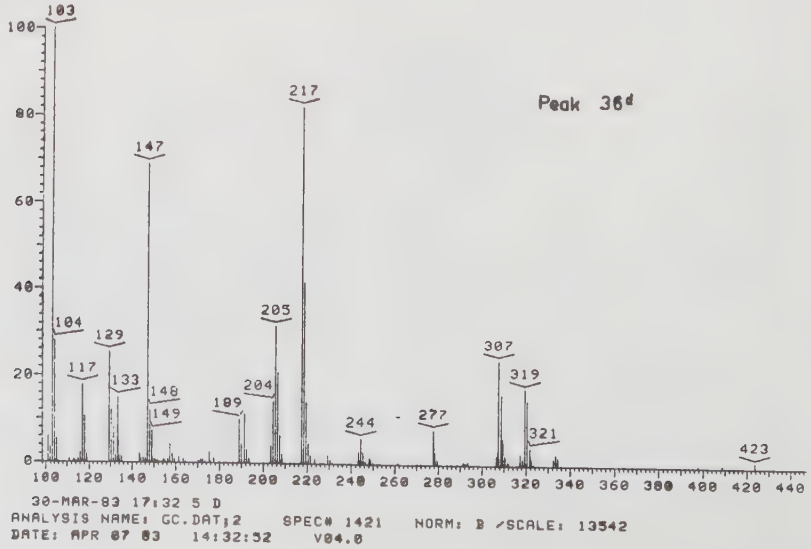


Abb. 46 : Massenspektrum von Peak 36



Peak 37 Ribit

Die Massenspektren sind, abgesehen von geringfügigen Intensitätsunterschieden identisch mit denen von Peak 36

Peak 38 bis 40 nicht auswertbar, da Intensität der Massenspektren zu gering.

Peak 41 Hexometasaccharinsäure

Aufgrund der Massenspektren und der GC-Daten sowie Vergleich mit der Literatur handelt es sich um die Hexometasaccharinsäure.

Tab.21 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 41

m/e	Fragment-Ion
321	M^+- COOTMS - CHOTMS
307	M^+- COOTMS - CHOTMS - CH_2
231	M^+- COOTMS - CHOTMS - HOTMS
219	COOTMS - CHOTMS
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS
204	CHOTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

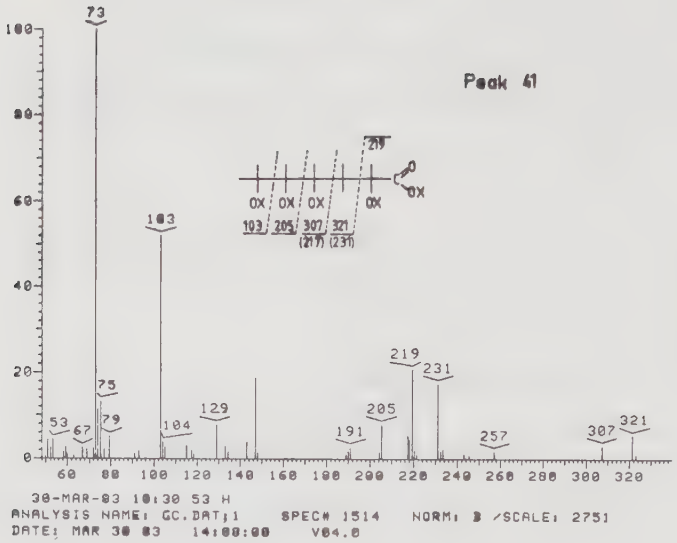
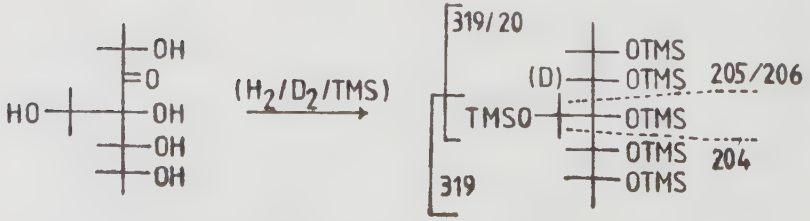


Abb. 47 : Massenspektrum von Peak 41

Peak 42 Aufgrund des Fehlens der Masse m/e 204 und des Auftretens von C-2, C-3 und C-4 Fragmenten in deuterierter und nicht deuterierter Form dürfte es sich um eine an C-3 verzweigte Ketohexose (2) handeln (vgl. Tab. 22 und Abb. 48)



Tab. 22 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 42

m/e	Fragment-Ion
421/2	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS
319/20	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS - HOTMS
307/8	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS - CHOTMS
217/8	C-3 Fragment
205/6	CH_2OTMS - CHOTMS bzw. CH_2OTMS - CDOTMS
103/4	CH_2OTMS bzw. CHDOTMS

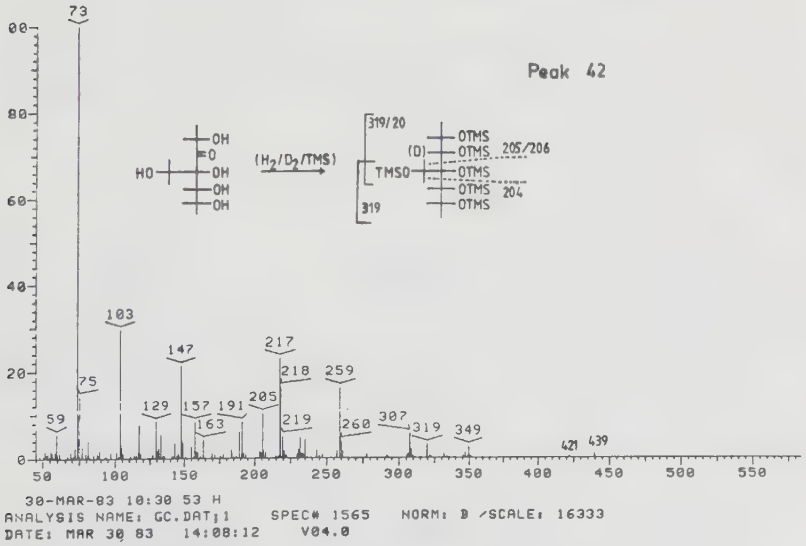


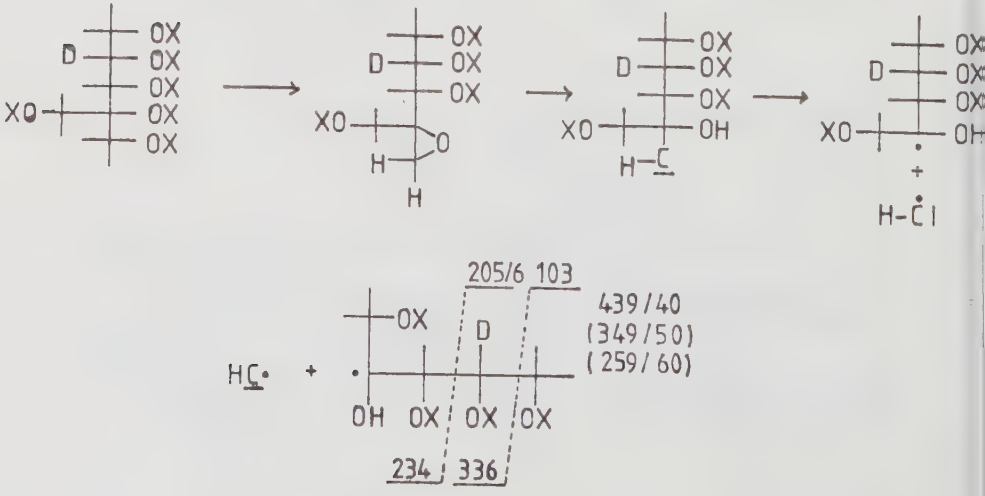
Abb. 48 : Massenspektrum von Peak 42

Peak 43 zu Peak 42 stereoisomerer verzweigter Hexit, 3-Hydroximethyl-Pentit.

Peak 44, 45 nicht auswertbar, da Intensität der Massenspektren zu gering.

Peak 46, 47 und 48 zeigen ähnliche Massenspektren (vgl. Abb.49-54) Es dürfte sich hierbei um Stereoisomere des Dendrohexits handeln. In allen Fällen ist die Carbonylgruppe an C-2, da die Masse m/e 204 nicht, dafür aber m/e 205/6 sowie m/e 319 und 320 bei den Spektren der deuterierten Verbindungen auftreten.

Für eine Verzweigung an C-4 spricht das Auftreten der m/e-Werte 439, 349, 259, die nachfolgenden Schematas entstandem sein dürften:



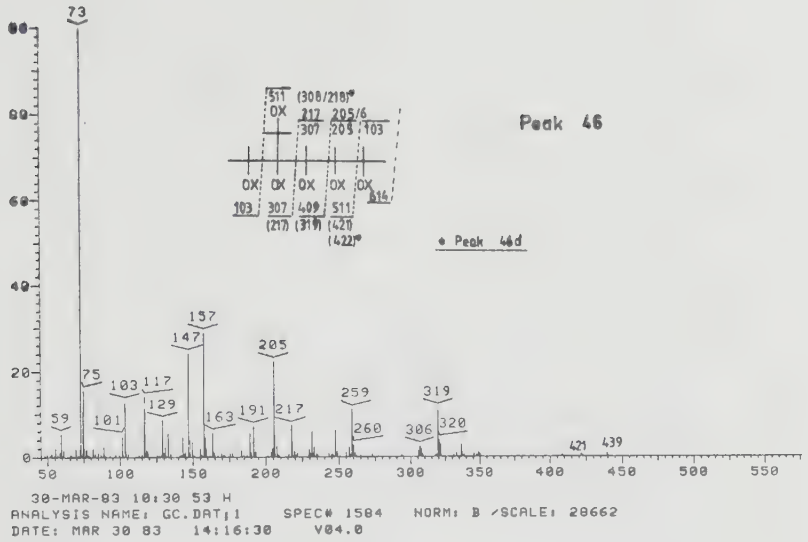


Abb. 49 : Massenspektrum von Peak 46 (hydriert)

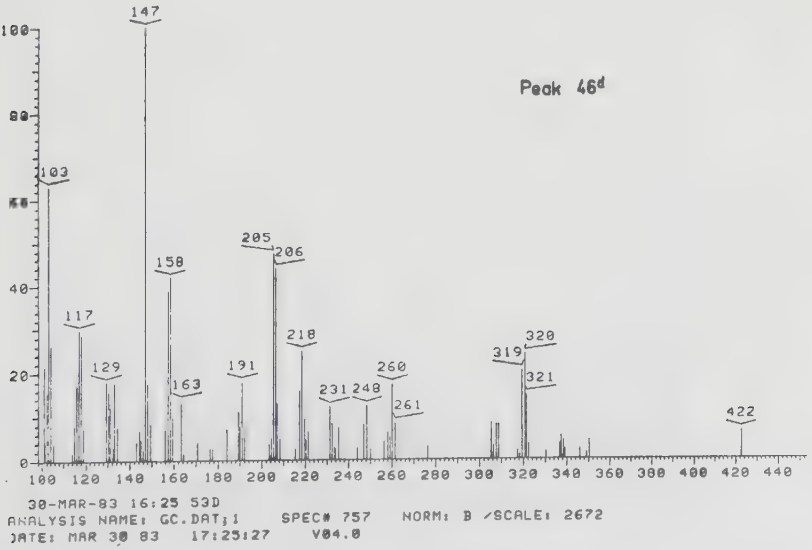


Abb. 50 : Massenspektrum von Peak 46 d (deuteriert)

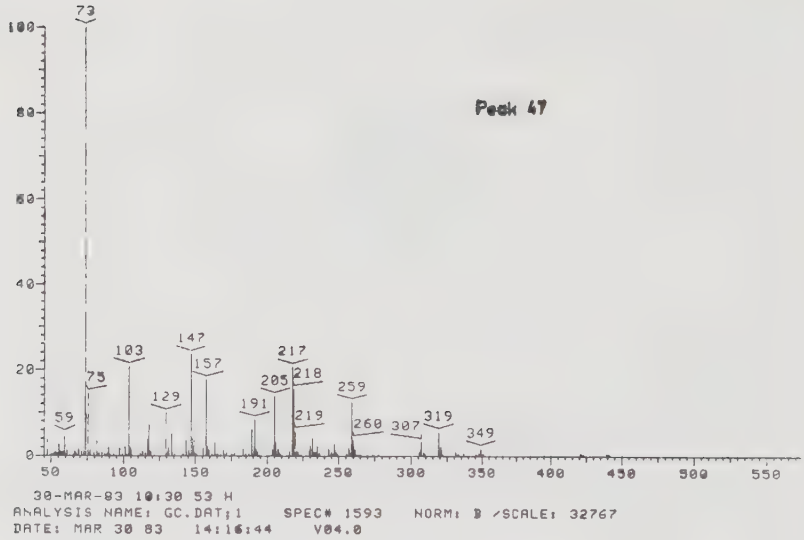


Abb. 51 : Massenspektrum von Peak 47 (hydriert)

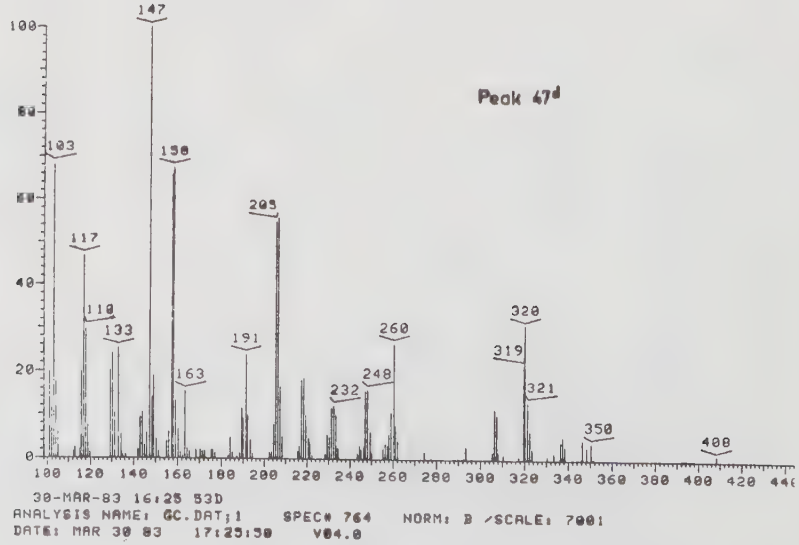


Abb. 52 : Massenspektrum von Peak 47 d (deuteriert)

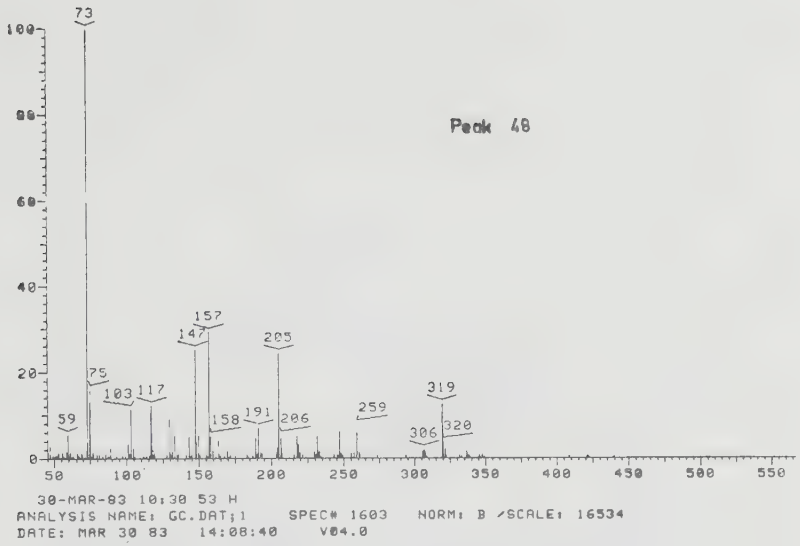


Abb. 53 : Massenspektrum von Peak 48 (hydriert)

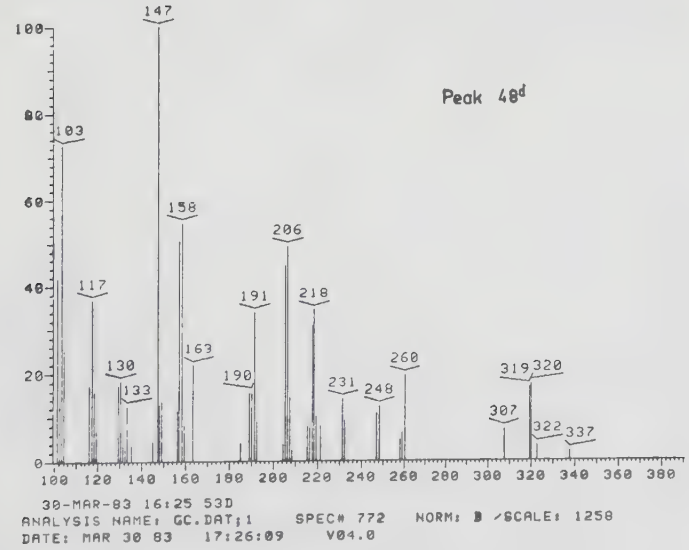


Abb. 54 : Massenspektrum von Peak 48 d (deuteriert)

Peak 49 bis 51 nicht auswertbar, da Intensität der Massenspektren zu gering.

Peak 52 nicht verzweigter Hexit, Folgeprodukt einer Aldohexose, da m/e 421 und 422 beim deuterierten Derivat zu finden sind (vgl. Abb. 55 und Tab. 8).

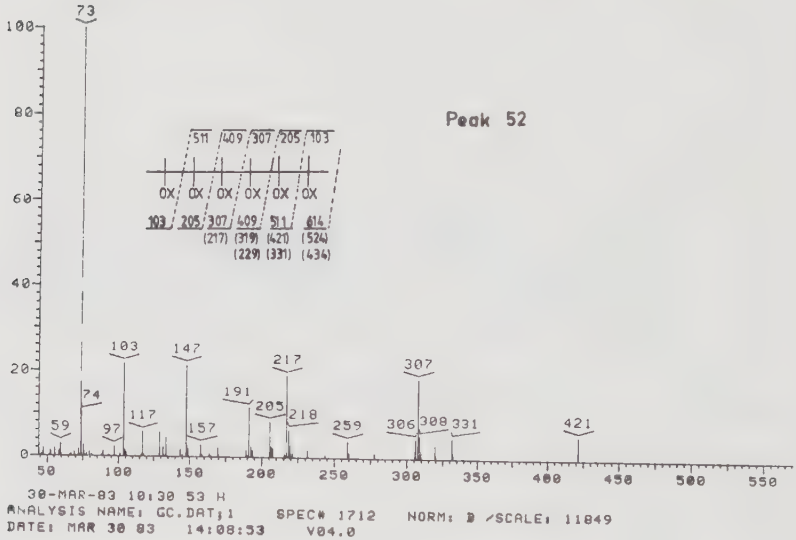


Abb. 55 : Massenspektrum von Peak 52 (hydriert)

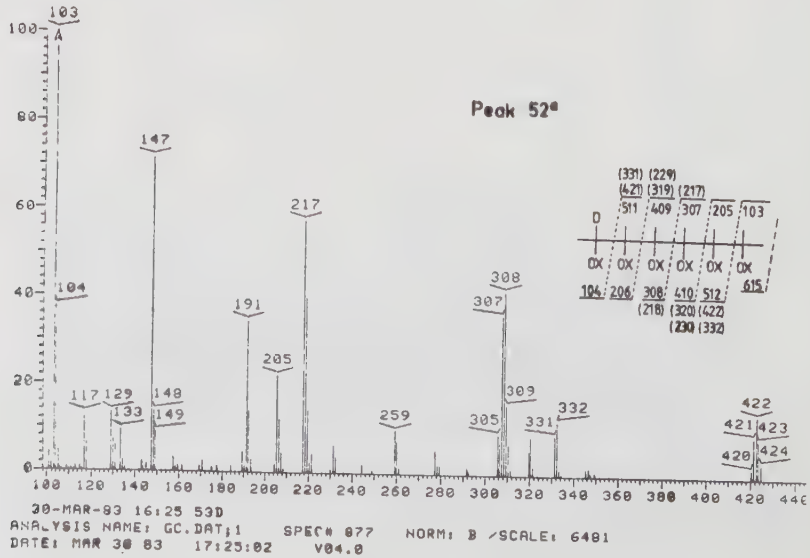


Abb. 56 : Massenspektrum von Peak 52 d (deuteriert)

Peak 53 Hexit, Folgeprodukt einer 2-Ketohexose, vgl. Abb. 57 und Fragmentierungsschema in Tab. 8.

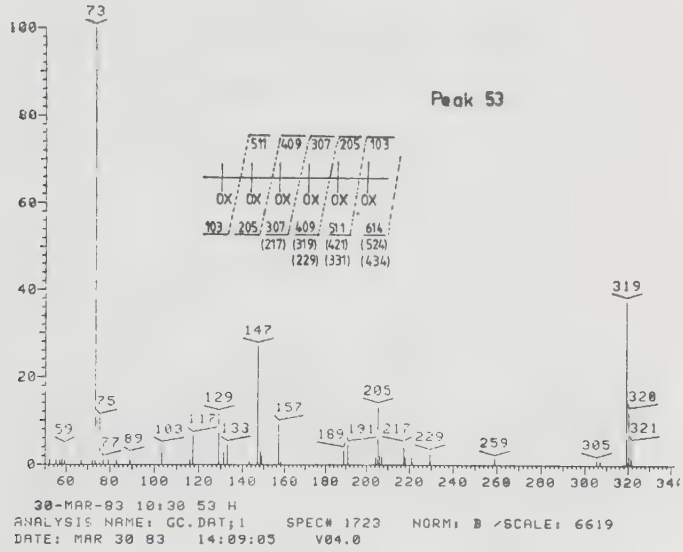


Abb. 57 : Massenspektrum von Peak 53 (hydriert)

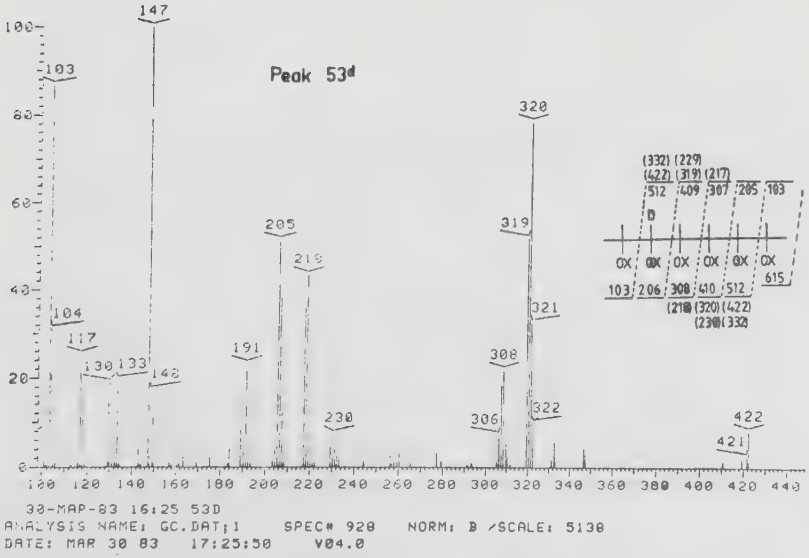


Abb. 58 : Massenspektrum von Peak 53 d (deuteriert)

Peak 54 nicht auswertbar, da Intensität der Massenspektren zu gering.

Peak 55 Hexit (Allit), Folgeprodukt einer 2-Ketohexose, die Massenspektren sind abgesehen von geringfügigen Intensitätsunterschieden identisch mit denen des Peaks 53 (vgl. Abb. 57 und Tab. 8).

Peak 56 - 58 Die Massenspektren dieser Peaks sind identisch und zeigen das typische Fragmentierungsverhalten von Hexiten (vgl. Tab. 8).
Abb. 59 zeigt das Massenspektrum von Peak 57.
Aufgrund des chromatographischen Verhaltens und des Vergleichs mit Standardverbindungen ist Peak 56 Mannit, Peak 57 Sorbit und Peak 58 Idit und Dulcit.

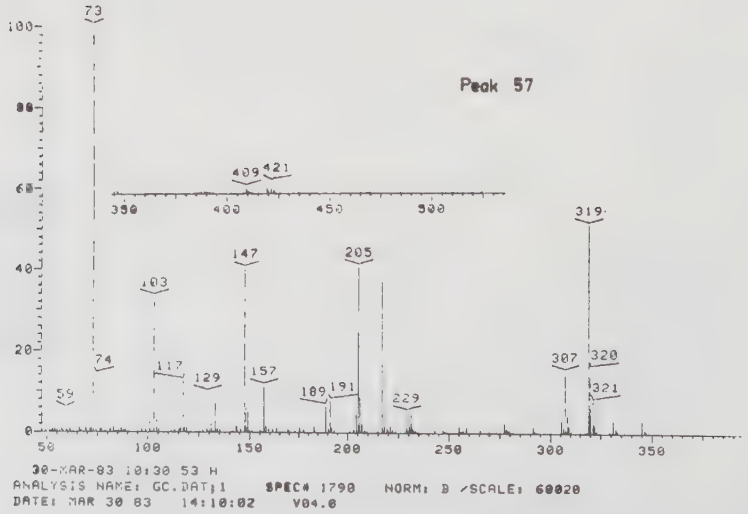


Abb. 59 : Massenspektrum von Peak 57 (hydriert)

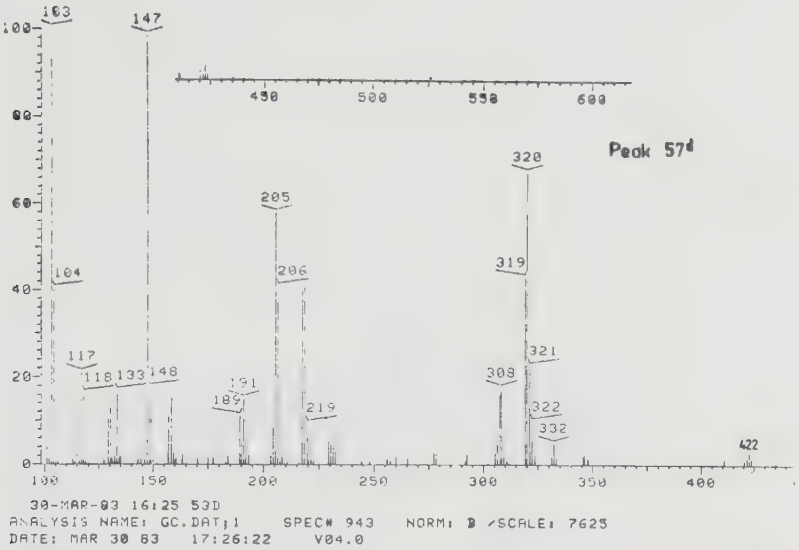


Abb. 60 : Massenspektrum Peak 57 d (deuteriert)

Peak 59 bis 66 nicht auswertbar, da die Intensitäten zu gering sind.

Peak 67 Aufgrund des Auftretens der Masse m/e 349 sowie m/e 307/8 und 319/20 in Spektrum des deuterierten Derivates dürfte es sich um einen verzweigten Heptit handeln.

Der Verzweigungsort müsste danach (m/e 349) an C-4 sein (vgl. Abb. 49 und Legenden Peak 46).

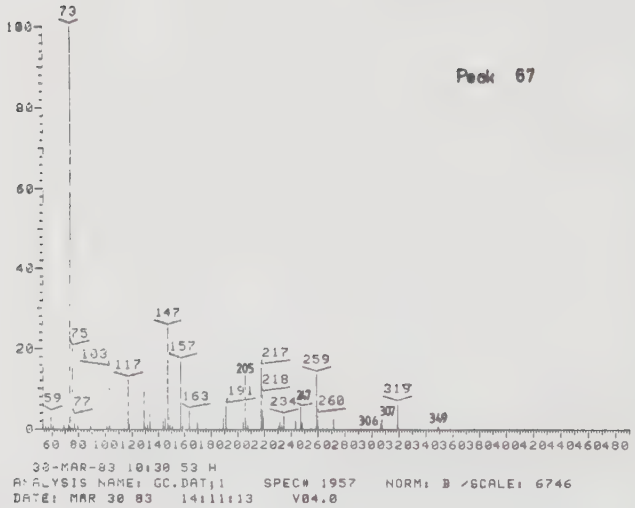


Abb. 61 : Massenspektrum von Peak 67 (hydriert)

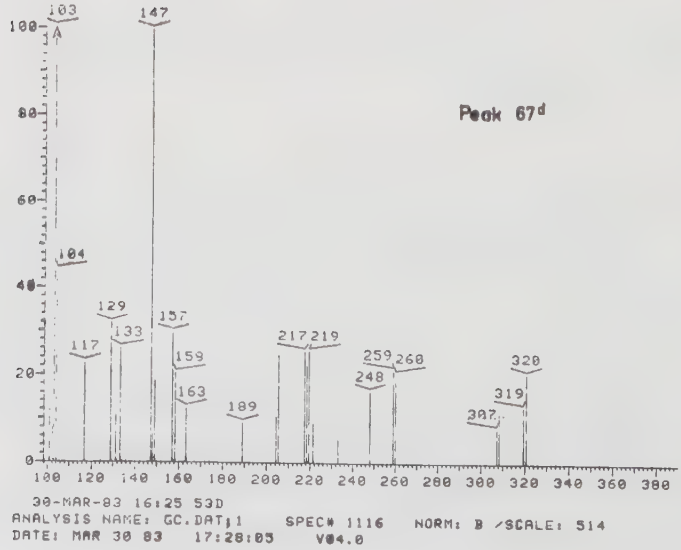


Abb. 62 : Massenspektrum von Peak 67 d (deuteriert)

Peak 68 nicht auswertbar, da die Intensität der Massenspektren zu gering ist.

Peak 69 Das Auftreten der m/e-Werte 439, 349 und 359 sowie der m/e-Werte 421, 319, 307, 217 und 205 als auch das chromatographische Verhalten spricht für einen verzweigten Heptit, 4-Hydroximethyl-hexit.
Vgl. Abb. 49 und Legenden Peak 46/47.

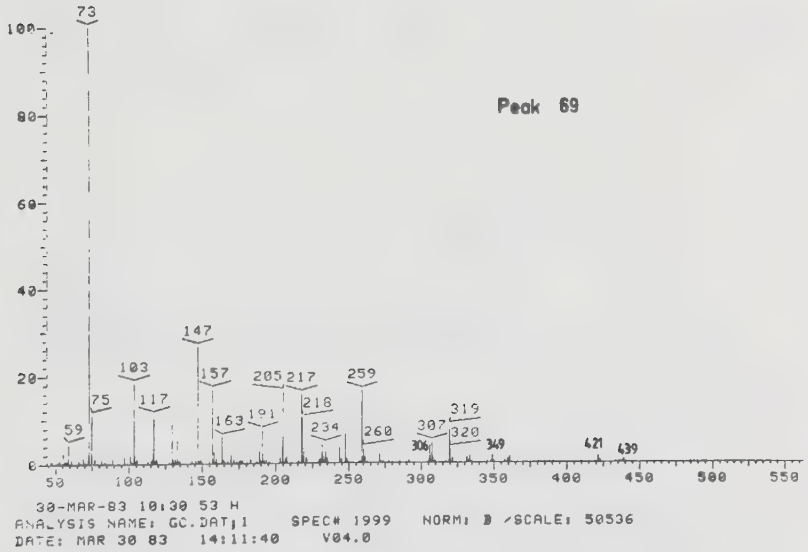


Abb. 63 : Massenspektrum von Peak 69 (hydreiert)

Peak 70 evtl. ebenfalls verzweigter Heptit. Die schwache Intensität des Massenspektrums lässt jedoch eine eindeutige Aussage nicht zu.

Peak 71 Es handelt sich um einen verzweigten Heptit, wie die m/e-Werte 439, 349 und 259 zeigen. Da jedoch die m/e-Werte 541, 451 ebenfalls auftreten muss ein 3-Hydroximethyl-hexit vorliegen (vgl. Legenden Peak 46 und 47).

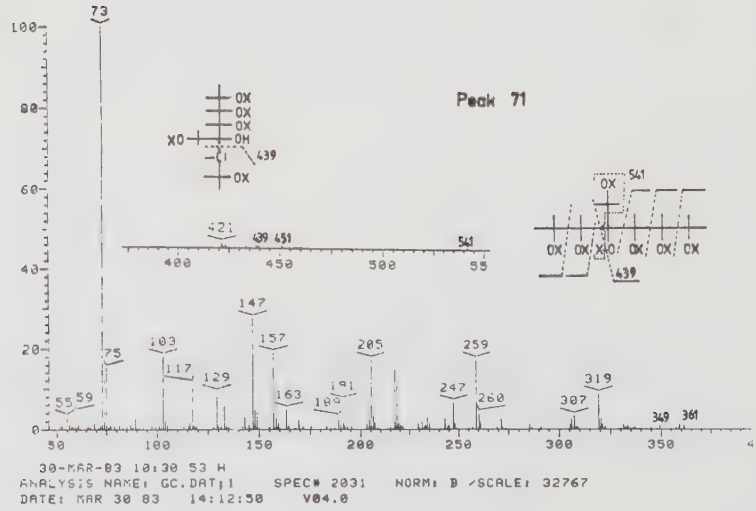


Abb. 64 : Massenspektrum von Peak 71 (hydriert)

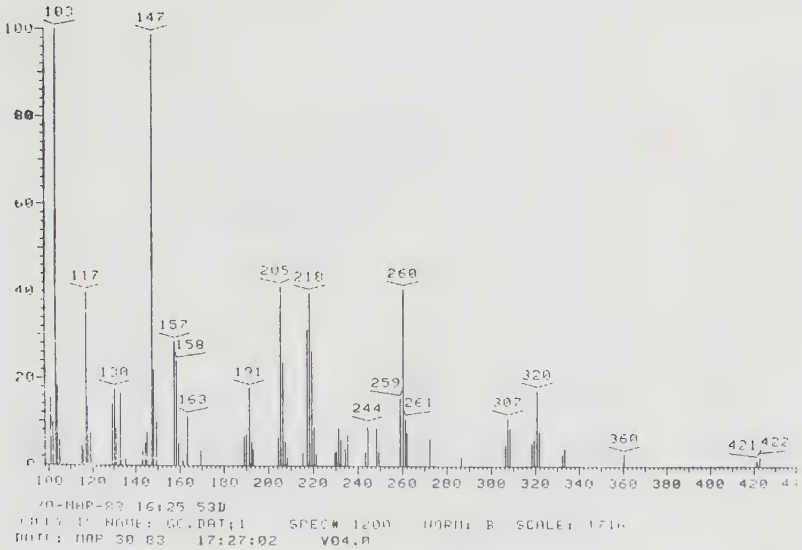


Abb. 65 : Massenspektrum von Peak 71 (deuteriert)

Peak 72 Die Intensität des Massenspektrums der hydrierten und auch der deuterierten Fraktion ist sehr gering. Da die Masse m/e 205 nach der Deuterierung erhalten bleibt und ausserdem die m/e-Werte 439, 349, und 259 gefunden werden, dürfte es sich um ein Folgeprodukt einer an C-4 verzweigten Heptulose (3) handeln, da ferner die m/e-Werte 361 und 271 gefunden werden, die für das Vorhandensein einer Glycol-Gruppierung am verzweigten C-Atom sprechen (vgl. Legende von Peak 46 - 48).

Tab. 23 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 72

m/e	Fragment-Ion
439	M^+ - CH_2OTMS - CH - TMS - OTMS
421/22	M^+ - CHOTMS - HOTMS
361/62	M^+ - CH - TMS - OTMS - $(HOTMS)_2$
349/50	m/e 435 - HOTMS
319/20	M^+ - CHOTMS - $(CHOTMS)_2$
307/8	CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$
271/2	m/e 361/2 - HOTMS
259/60	m/e 349/50 - HOTMS
217/18	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS

Peak 73 Das Massenspektrum ist mit dem des Peaks 72 ähnlich. Es dürfte sich ebenfalls um einen verzweigten Heptit handeln. Da die Intensität des Massenspektrums des deuterierten Derivates gering ist, kann über die Position der Carbonylgruppe keine Aussage gemacht werden.

Peak 74 Die m/e-Werte 361/71 sowie 259/60 sprechen für einen an C-4 verzweigten Heptit (vgl. Legende von Peak 46). Die Position der Carbonylgruppe muss an C-2 gewesen sein, da das deuterierte Derivat den m/e-Wert 206 zeigt, der allerdings neben m/e 205 gefunden wird, was für ein weiteres endständiges Glycolpaar und damit für die vorgeschlagene Struktur spricht (vgl. Abb. 66 und 67).

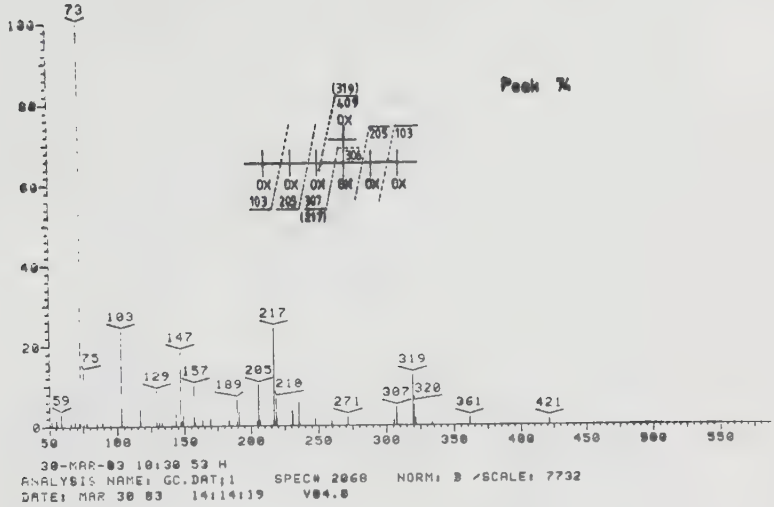


Abb. 66 : Massenspektrum von Peak 74 (hydriert)

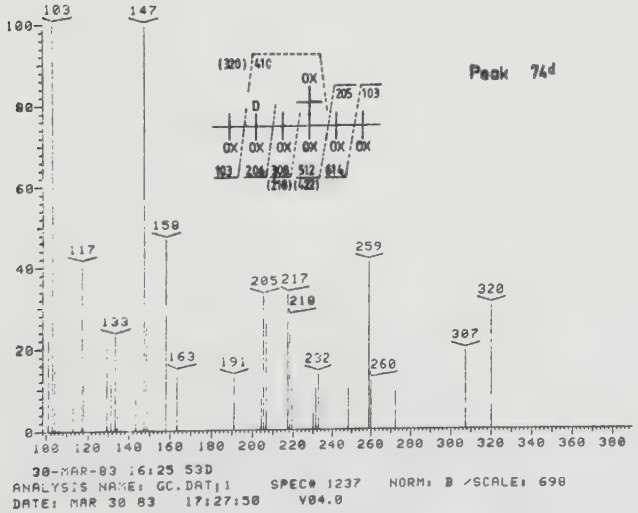
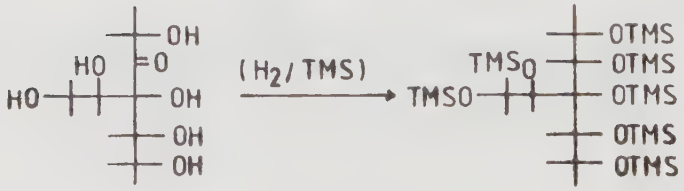


Abb. 67 : Massenspektrum von Peak 74 d (deuteriert)

Peak 75 und 76 Die erhaltenen Massenspektren der hydrierten Derivate zeigen eine geringe Intensität, die der deuterierten Form sind nicht auswertbar. Da die m/e-Werte (361 und 271) und die Reste 319, 307, 217, 205 und 203 gefunden werden, dagegen aber weder m/e 349 noch 259 auftreten, könnte es sich um eine Folgeprodukt eines Additionsproduktes einer Pentulose mit Glycolaldehyd handeln (vgl. Abb. 68).



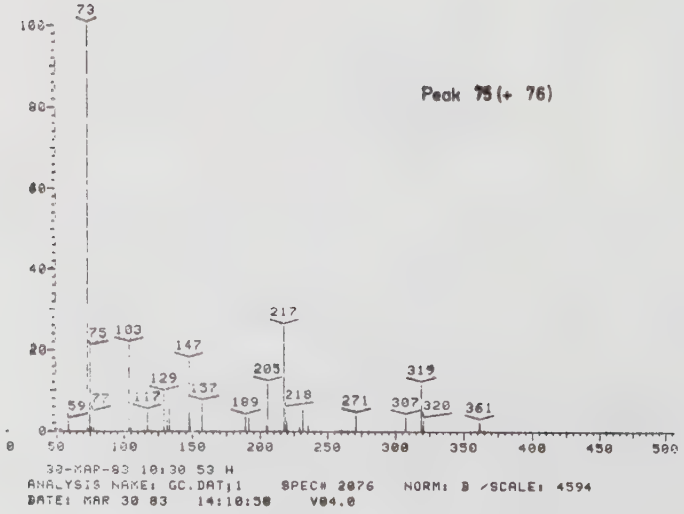


Abb. 68 : Massenspektrum von Peak 75 (hydriert)

Peak 77 und 78 nicht auswertbar, da die Intensität der Massen**spektren zu gering ist.**

Peak 79 bis 83 nicht verzweigte Heptite

Die erhaltenen Massenspektren sind, abgesehen von Intensitätsunterschieden, identisch, Abb. 69 und 70 zeigen die Massenspektren von Peak 82 der hydrierten und deuterierten Form.

Für das Vorliegen von Heptiten spricht das Auftreten der m/e-Werte 523 und 524 (durch Isotopeneffekt 524/25), die durch Abspaltung von CH_2OTMS und HOTMS entstehen.

Die m/e-Werte 447 und 357 dürften durch Eliminierung zweier HOTMS und Abspaltung einer OTMS- bzw. einer weiteren HOTMS-Gruppierung entstanden sein. In Tab. 9 sind die zu erwartenden Fragment-Ionen von hydrierten und deuterierten Heptiten zusammengestellt.

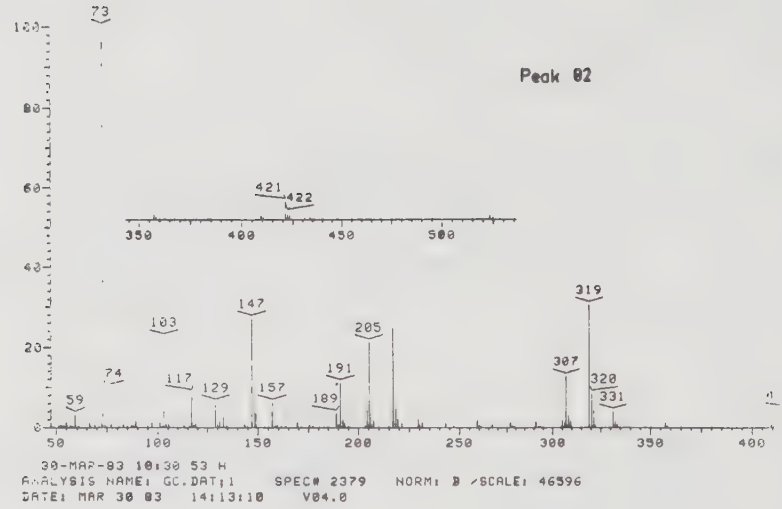


Abb. 69 : Massenspektrum von Peak 82 (hydriert)

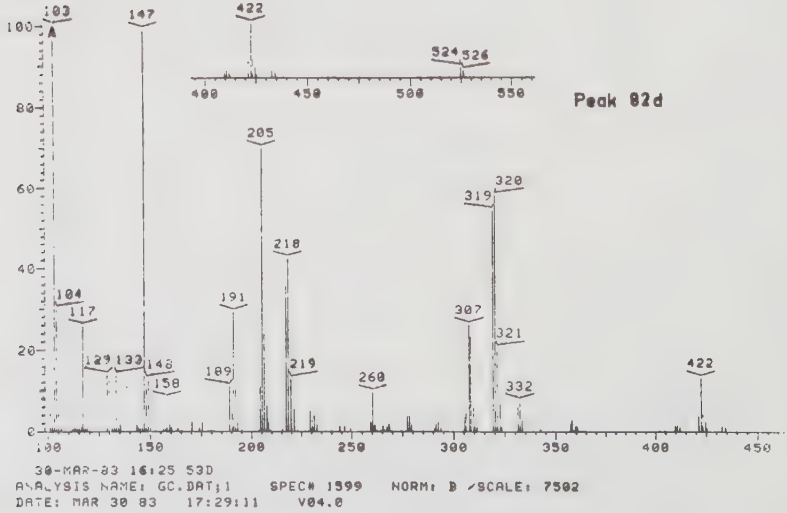


Abb. 70 : Massenspektrum von Peak 82 d (deuteriert)

Aufgrund der Intensitätsverhältnisse der m/e-Werte 421/2, 409/10, 331/2, 319/20, 307/8, 217/8 und 205/6 läßt sich abschätzen, in welcher Stellung sich die Carbonylgruppen befanden.

Tab.24 : Position der deuterierten Gruppen der Heptite
Angaben in %

Peak	C 1	C 2	C 3	4
79	15%	5%	60%	20%
80	15%	10%	70%	unter 5%
81	12%	23%	60%	unter 5%
82	20%	10%	65%	5%
83	12%	7%	68%	2,5%

Peak 86 nicht auswertbar, da Intensität der Massenspektren zu gering.

Peak 87 Aufgrund der Massenspektren kann es sich nur um einen an C 4 verzweigten Octit handeln, der an C 2 deuteriert ist. Es dürfte ein Folgeprodukt eines Additionsproduktes einer Pentulose (3) und eines Glycerinaldehyds sein.

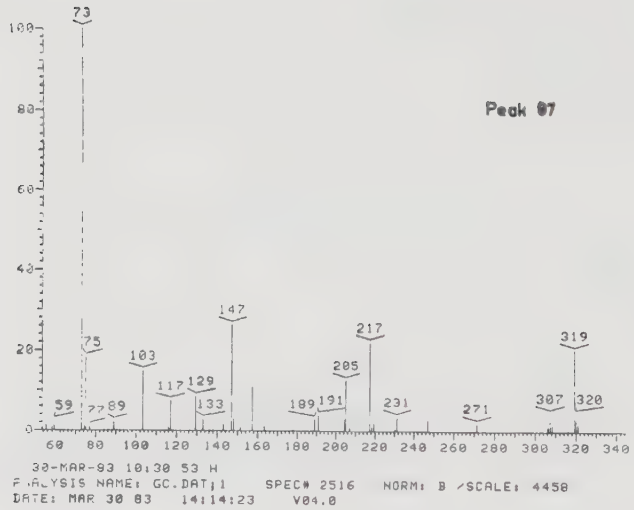


Abb. 71 : Massenspektrum von Peak 87 (hydriert)

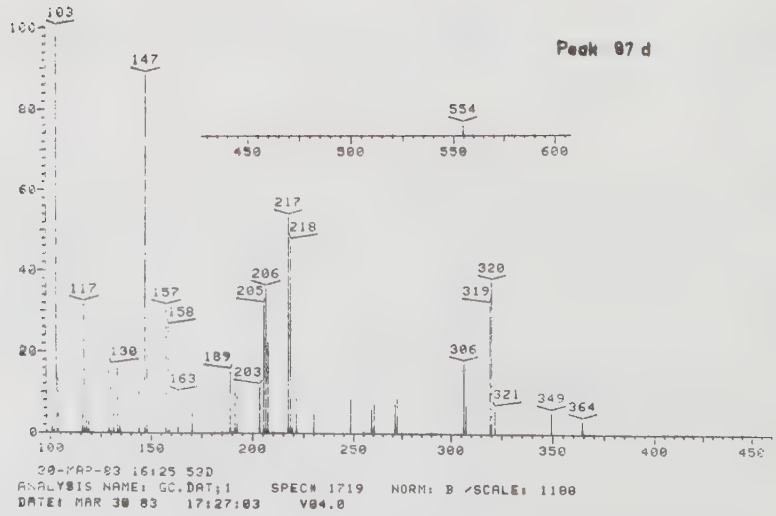


Abb. 72 : Massenspektrum von Peak 87 d (deuteriert)

Peak 88 Die Intensität der Massenspektren ist sehr gering, sodaß keine eindeutige Aussage möglich ist. Das Auftreten der m/e-Werte 361/2 und 241/2 könnten durch die Abspaltung von TMS - OTMS und $CH_2OTMS - \dot{C}H$ zu 541 und Eliminierung von 2 bzw. 3 HOTMS - Resten entstanden sein (vgl. Legende zu Peak 46). Demnach sollte es sich um ein Folgeprodukt einer an C-3 verzweigten (m/e 217/8) Oktose handeln (vgl. Abb. 73 und 74).

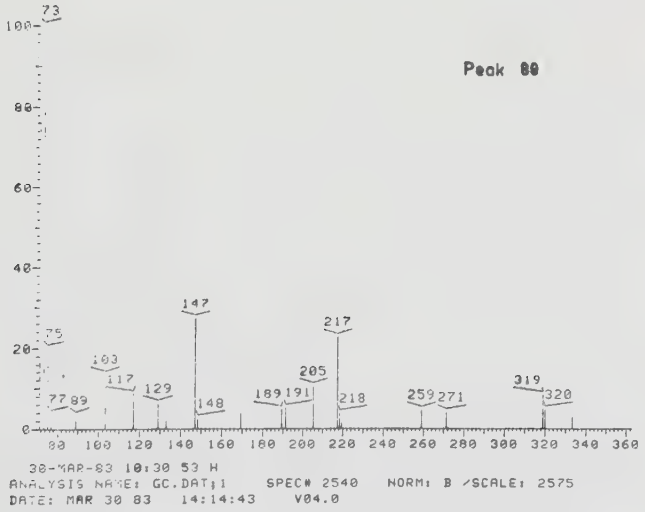


Abb. 73 : Massenspektrum von Peak 88 (hydriert)

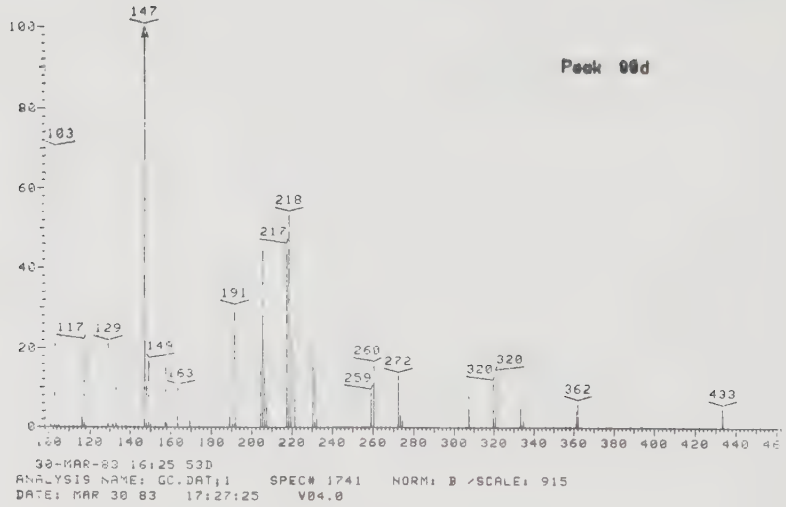


Abb. 74 : Massenspektrum von Peak 88 d (deuteriert)

Peak 89 Die m/e-Werte 361/271 sowie 319/20, 307, 259, 217/18, 205/6 und die Isotopenverteilung der Deuterierung sprechen für 2 endständige Glycolpaare und eine Verzweigung an einem der Glycolpaare. Die m/e-Werte 435/6 zeigen die Abspaltung eines Glycolrestes und zweier OTMS-Reste an. Eine Auswertung ist jedoch wegen der zu geringen Intensität nicht möglich. Fest steht lediglich, daß die Carbonylgruppe der Oktose an C-2 war und daß dieses Glycolpaar wiederum mit dem verzweigten C-Atom benachbart ist. (Vgl. Abb. 75 und 76)

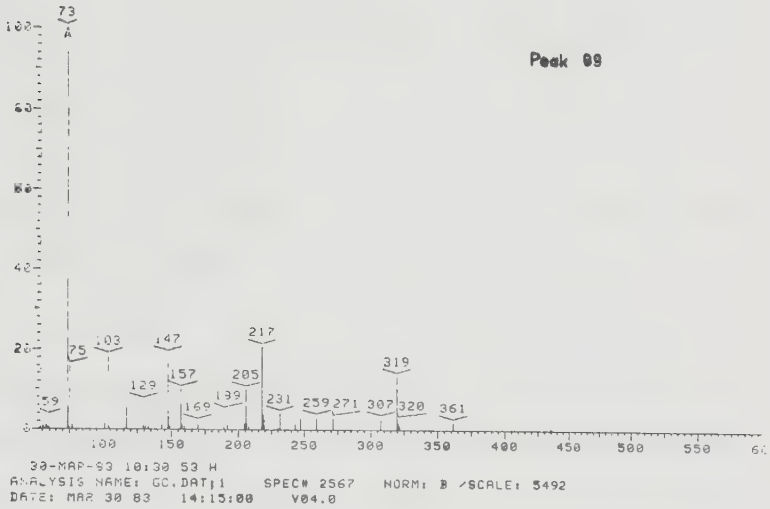


Abb. 75 : Massenspektrum von Peak 89 (hydriert)

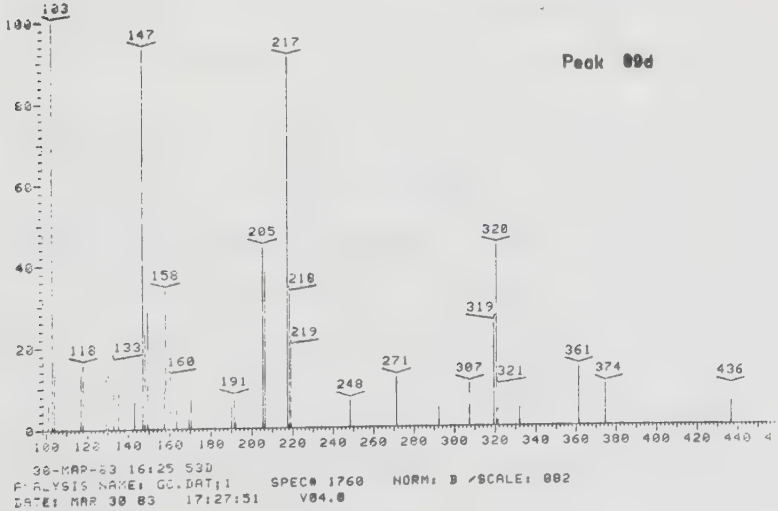


Abb. 76 : Massenspektrum von Peak 89 d (deuteriert)

Peak 90 nicht auswertbar, da die Intensität der Massenspektren zu gering ist.

7. Präparative Auftrennung der Formose

Das eingeengte Produktgemisch der Formose-Reaktion wird in wenig 85%-igem Ethanol gelöst und dann auf eine Säule, die mit stark saurem Ionenaustauscher (DOWEX 50 WX 8, 200-400 mesh), der zuvor in die Lithiumform übergeführt wird, aufgetragen. Anschließend wird mit 85%-igem Ethanol eluiert. Von jeder erhaltenen Fraktion werden 10 µl zur Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes mit dem Zuckeranalysator entnommen. Als Farbreaktion wird hier die Perjodat-Acetylaceton-Reaktion mit photometrischer Bestimmung bei 420 nm verwendet. In Abb. 77 wird ein erhaltenes Chromatogramm gezeigt.

Die isolierten Fraktionen werden mit der gekoppelten Gaschromatographie / Massenspektrometrie untersucht.

Da Zucker schwerflüchtig sind, ist es notwendig diese, wie die Polyalkohole, zuvor in unzersetzt verdampfbare Derivate zu überführen.

Besonders geeignete Derivate von Zuckerkomponenten sind die TMS-Derivate. Das sirupöse Rohprodukt wird zuerst in Pyridin gelöst, dann mit Hexamethylensilazan und anschließend mit Chlormethylsilan umgesetzt. Die Reaktionslösung wird danach mit Stickstoff abgeblasen und die derivatisierten Produkte in Dichlormethan aufgenommen. 1 - 5 µl dieser Lösung werden über Kapillarsäulen gaschromatographisch getrennt und die danach gefundenen Peaks massenspektrometrisch untersucht.

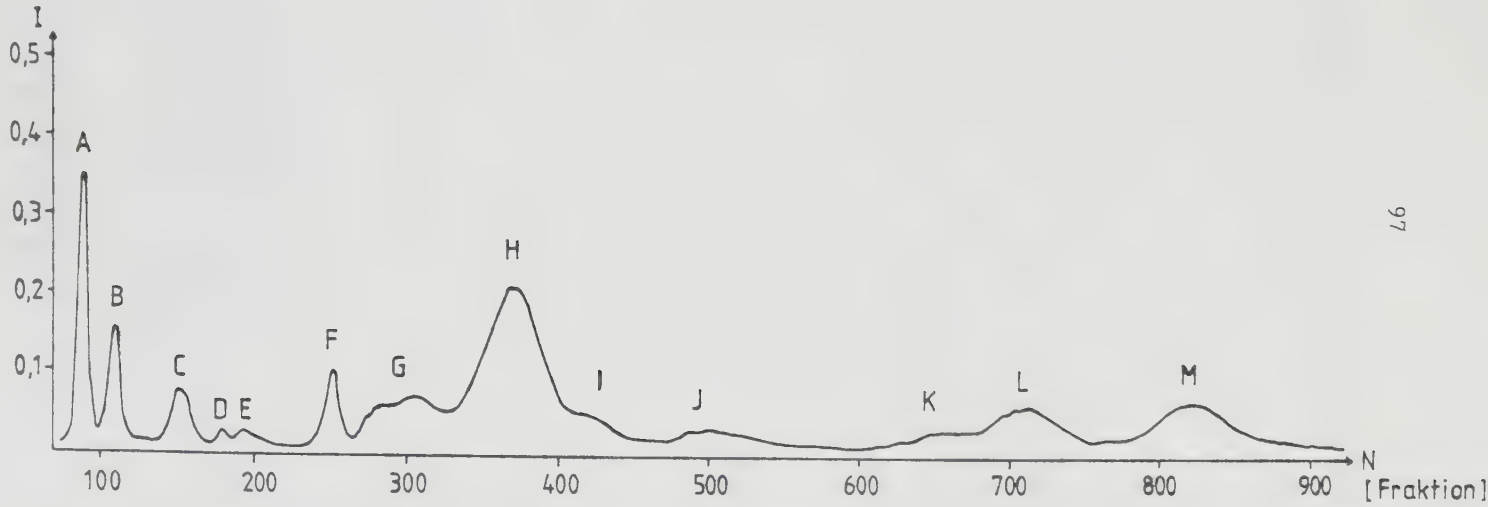


Abb. 77 : Verteilungschromatographie an stark saurem Ionenaustauscher (DOWEX 50 WX 8, 200-400 mesh, Li-Form)

Säule: 200 x 2,5 cm i.D.: Elutionsmittel: 85 %-iges Ethanol: Farbreagenz: Perjodat-Acetylaceton: Photometer: 420 nm

Probe: Formose-Rohprodukt, nach 53-minutiger Reaktionsdauer

Hieraus werden 13 Fraktionen (A bis M) gewonnen. In Tab. 25 ist die Zusammensetzung der gefundenen Fraktionen, die mit Hilfe des Zuckeranalysators untersucht wurden, zusammengestellt.

Fraktion A bis C bestehen aus niedermolekularen Zuckern. Ab Farktion G werden Zucker mit 5 oder mehr C-Atomen und einige Säure-Nebenprodukte gefunden. Die gesuchten wichtigen intermediären Kohlenhydrate sind in den Fraktionen D bis F.

Zur weiteren Identifizierung der einzelnen Zuckerkomponenten werden die verteilungschromatographisch erhaltenen Fraktionen mit der gekoppelten Gaschromatographie-Massenspektrometrie (= GC-MS) untersucht.

Tab.25: Identifizierung der Fraktionen der verteilungschromatographischen Trennung durch DOWEX 50 WX 8 (Li^+-Form) von Formose.

Fraktion A	Formaldehyd
Fraktion B	Glycolaldehyd
Fraktion C	Glycerinaldehyd, Dihydroxiaceton
Fraktion D und E	Rückspaltungsprodukte, evtl. aus Tetrulose
Fraktion F	Hauptbestandteil ist ein Isomerenpaar einer verzweigten Hexulose (3), das ca. 55% darstellt. Weitere ca. 25% sind eine Aldohexose, die in Furanoseform vorliegt.

Tab. 26 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen der Hexulose (2) aus Fraktion F

m/e	Fragment-Ion
437	$M^+ - CH_2OTMS$
347	$M^+ - CH_2OTMS - HOTMS$
319	$M^+ - CH_2OTMS - HOTMS - CO$
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb.116)
245	$M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS - HOTMS$
234	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb.116)
217	C-3 Fragment
205	$CH_2OTMS - CHOTMS$
103	CH_2OTMS

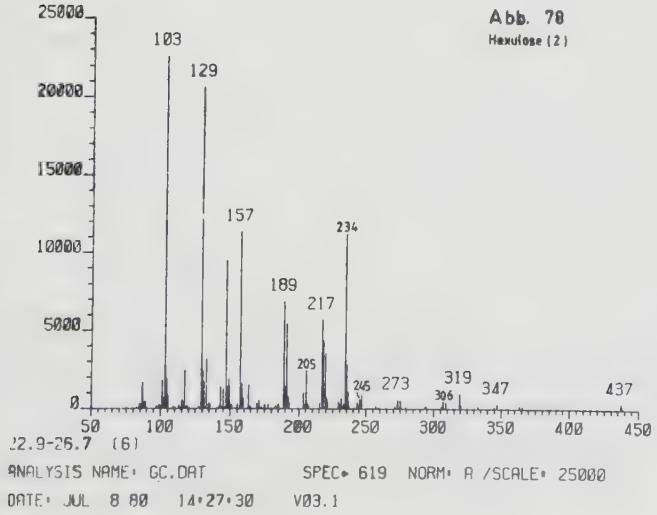


Abb. 78 : Massenspektren der Hexulose (2) aus Fraktion F

Die m/e-Werte 306 und 234 sprechen für eine offenkettige α, ß-Dihydroxicarbonylverbindung. Da m/e 319 und m/e 205, jedoch kein m/e 204 gefunden wird, sollte es sich um eine an C-3 verzweigte Hexulose (2) handeln.
Die entsprechende Aldohexose spaltet wie erwartet zunächst HOTMS zu m/e 435 ab. Die intensiven Massen bei m/e 347 und 307, sowie das Auftreten von m/e 205 läßt auf eine Aldofuranose schließen.

Tab. 27 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen der Aldofuranose in Fraktion F

m/e	Fragment-Ion
435	M^+- HOTMS
347	M^+- HOTMS - CH_2OTMS
319	M^+- HOTMS - CH_2OTMS - CO
307	C-3 Fragment
245	M^+- CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS

Fraktion G:
Im Gaschromatogramm konnten Aldopentosen (ca. 30%), eine Pentulose (2) (ca. 5%), Pentometasaccharinsäure (ca. 10%), Pentoisosaccharinsäure (ca. 5%) und eine Hexofuranose (ca. 15%) nachgewiesen werden.

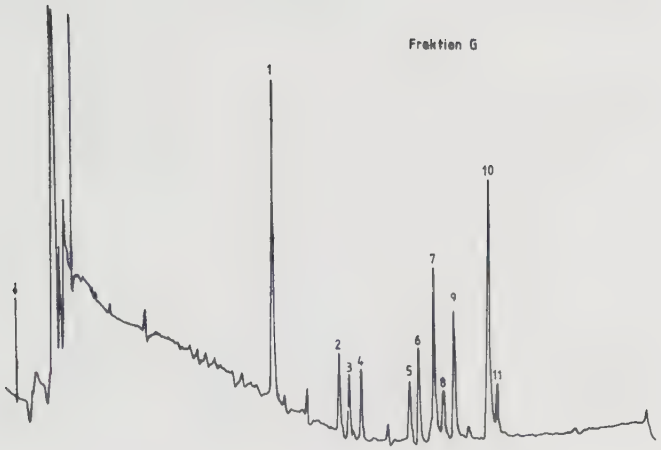


Abb. 79 : GC-Chromatogramm der Fraktion G

Peak 1	nicht auswertbar	Peak 7	Pentometasaccharinsäure
Peak 2	Pentofuranose	Peak 8	nicht auswertbar
Peak 3	Pentofuranose	Peak 9	Pentoisosaccharinsäure
Peak 4	Pentopyranose	Peak 10	Aldohexofuranose
Peak 5	Pentulose, offenkettig	Peak 11	Aldohexofuranose
Peak 6	Pentopyranose		

Da zunächt HOTMS und CH_3 und nicht CH_2OTMS abgespalten werden und außerdem der für Mc-Lafferty-Umlagerung typische m/e-Wert 234 auftritt, dürfte es sich um eine offenkettige Pentulose-(2) handeln.

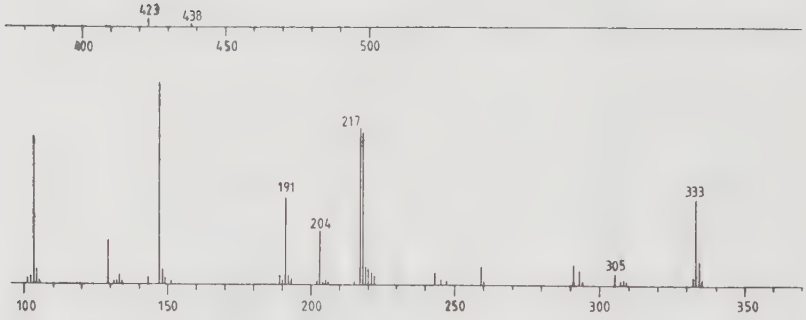


Abb. 80 : Massenspektrum der Fraktion G / Peak 2

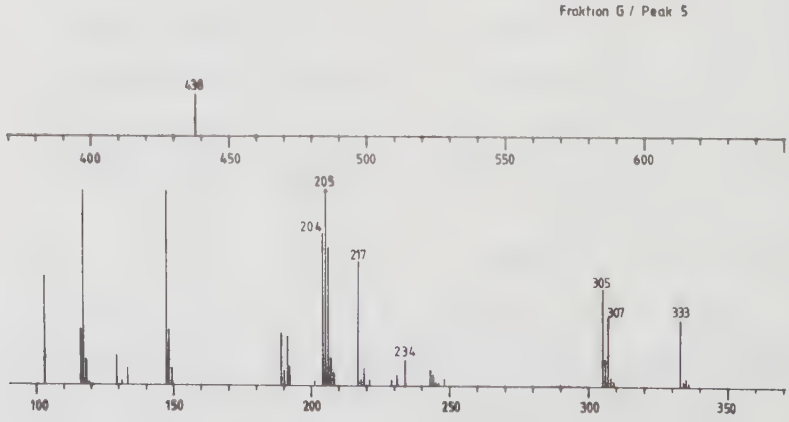


Abb. 81 : Massenspektrum der Fraktion G / Peak 5

Fraktion H besteht fast ausschließlich aus Pentosen und Hexosen.

Xylulose / Ribulose	ca. 2%
Ribose / Lyxose	ca. 8%
Fructose	ca. 15%
Arabinose	ca. 16%
Xylose	ca.16,5%
Glucose	ca. 9,5%
Hexulose (3)	ca. 14%
sonstige	ca. 15%

Die Hexulose liegt offenkettig vor. Da zunächst HOTMS zu m/e 435 abgespalten wird, scheidet eine Hexulose (2) aus.

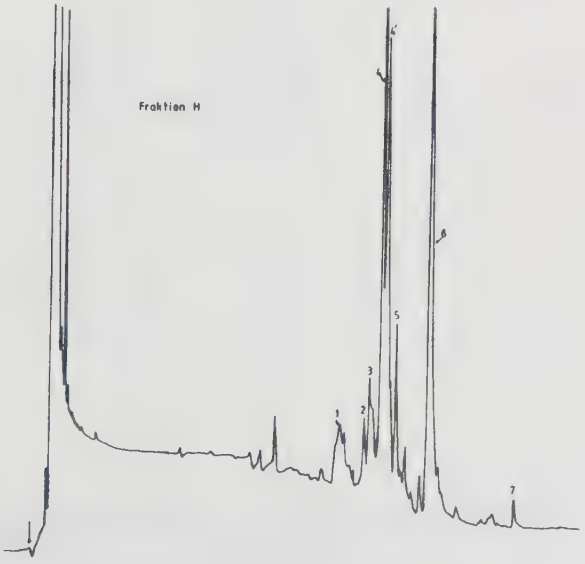


Abb. 82 : GC-Chromatogramm der Fraktion H

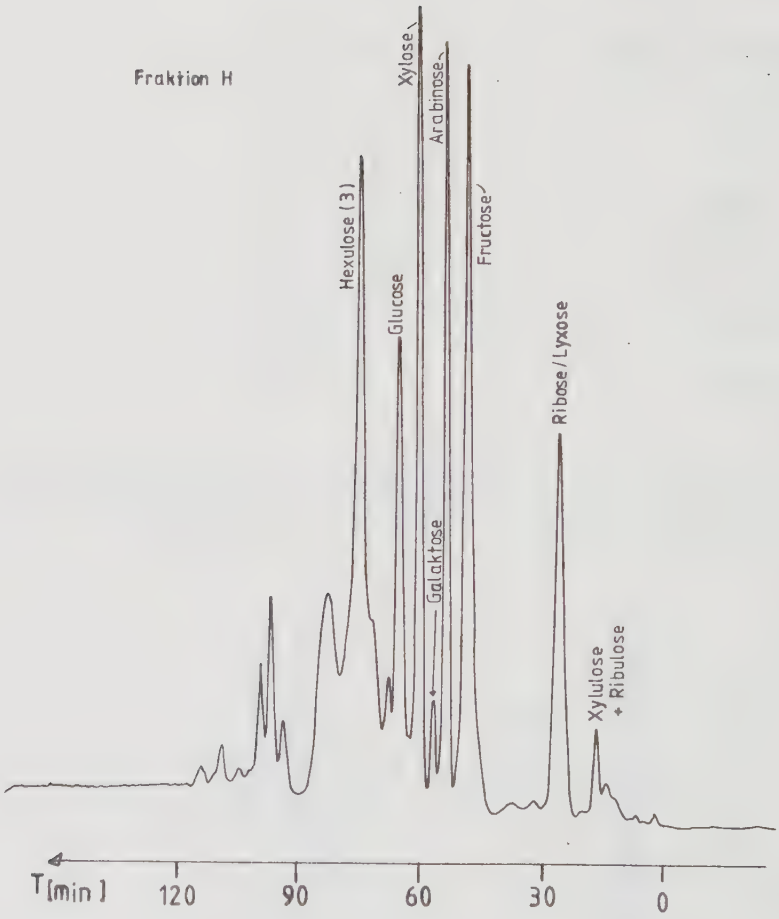


Abb. 83 : Flüssigkeitschromatographie (Zuckeranalysator)-Chromatogramm der Fraktion H.

Tab. 28 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen der Hexulose in Fraktion H

m/e	Fragment-Ion
435	M^+- CHOTMS
345	M^+- $(CHOTMS)_2$
307	C-3 Fragment
247	C-3 Fragment mit CO-Gruppierung nach Umlagerung von CH_3-Gruppierung
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS

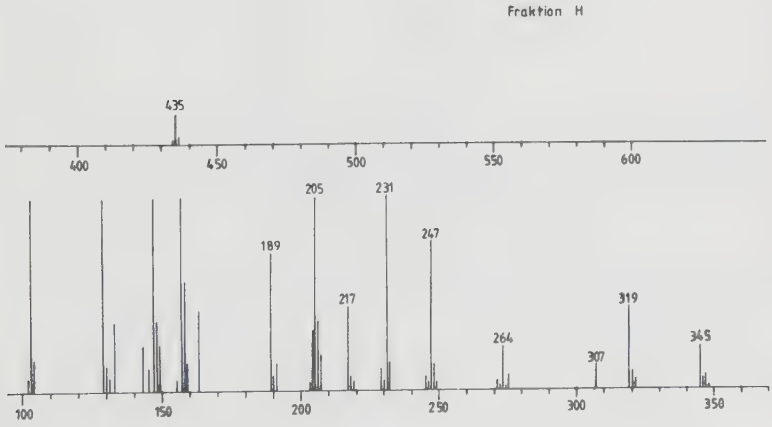


Abb. 84 : Massenspektrum der Fraktion H.

Fraktion I

Im Wesentlichen entspricht die Zusammensetzung dieser Fraktion der von Fraktion H, was durch den Bandenausläufer zu erwarten war.

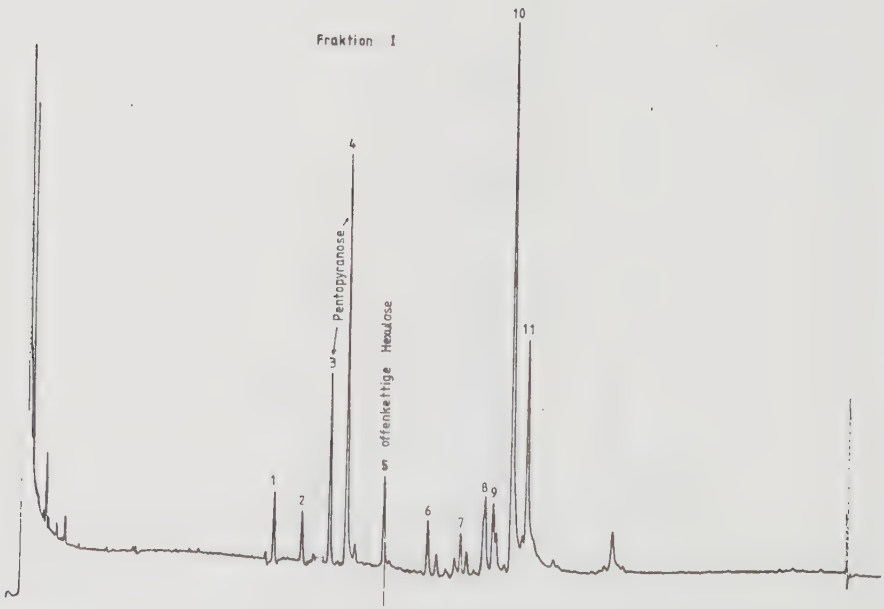


Abb.85: GC-Chromatogramm der Fraktion I

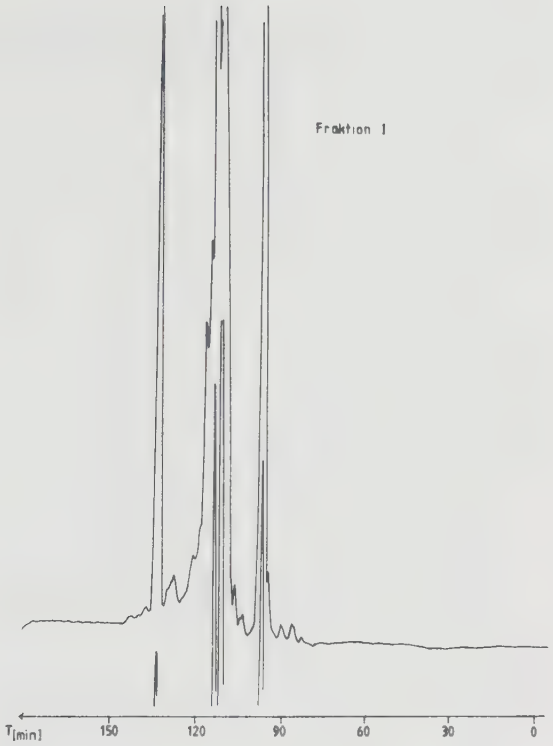


Abb. 86: Flüssigkeitschromatographie (Zuckeranalysator) - Chromatogramm der Fraktion I.

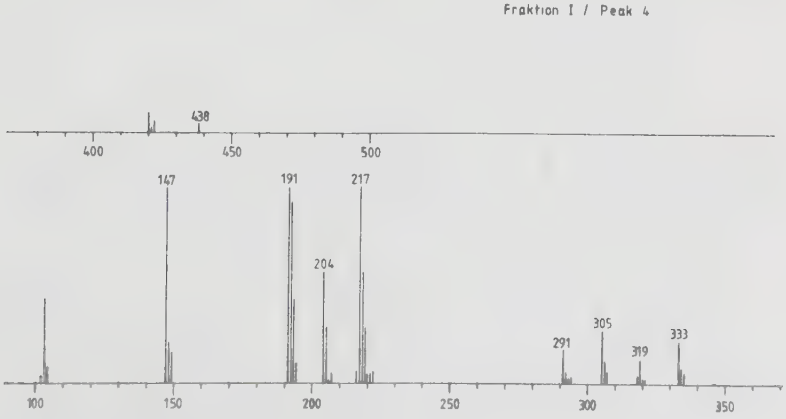


Abb. 87: Massenspektrum Faktion I / Peak 4

Peak 3 und 4 der Fraktion I zeigen das Fragmentierungsverhalten wie es von Pentopyranosen erwartet wird.

Tab. 29: Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen zur Fragmentierung in Pentopyranosen

m/e	Fragment-Ion
438	M^+
333	M^+ - HOTMS - CH_3
305	M^+ - HOTMS - CH_3 - CO
243	M^+ - 2 HOTMS - CH_3
217	C-3 Fragment
204	CHOTMS - CHOTMS

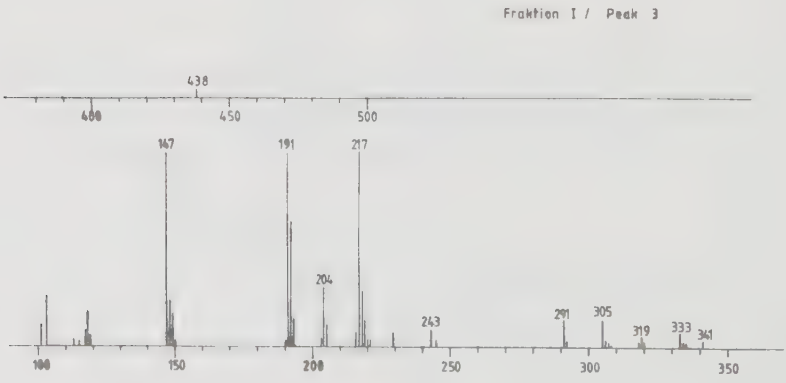


Abb. 88: Massenspektrum Fraktion I / Peak 3.

Tab. 30 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 5 aus Fraktion I

m/e	Fragment-Ion
438	M^+
335	M^+ - CH_2OTMS
333	M^+ - HOTMS - CH_3
307	M^+ - COOTMS
305	M^+ - CHOTMS - CH_3 - CH_2O
243	M^+ - HOTMS - CH_3 - HOTMS
233	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS
231	C-3 Fragment + CH_2
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS

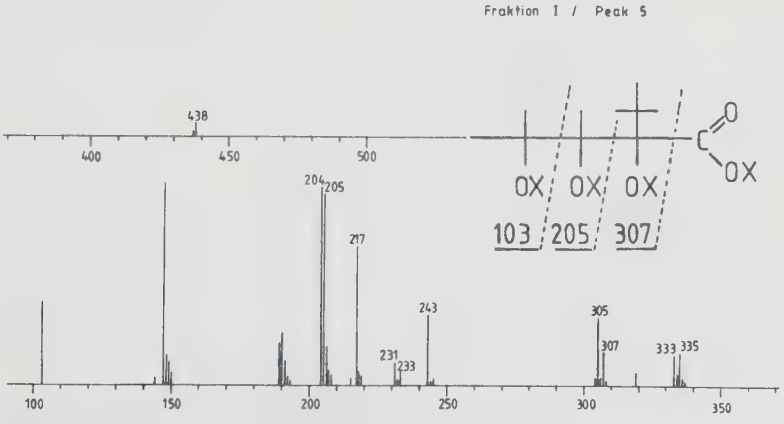


Abb. 89 : Massenspektrum Peak 5 der Fraktion I

Das Auftreten der Masse m/e 307 sowie m/e 205 und das Fehlen der Massen m/e 218 und 219 sprechen für die Struktur einer Pentosaccharinsäure.

Tab. 31 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 6 aus Fraktion I

m/e	Fragment-Ion
335	M^+ - CH_2OTMS
333	M^+ - HOTMS - CH_3
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb.116)
234	McLafferta-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb.116)
231	C-3 Fragment
219	COOTMS - CHOTMS
218	CHOTMS - CHOTMS - CH_2
205	CH_2OTMS - CHOTMS
204	(CHOTMS - CHOTMS) / COOTMS - CHOTMS - CH_3

Die Pentometasaccharinsäure fragmentiert gemäß dem nachfolgenden Schema:

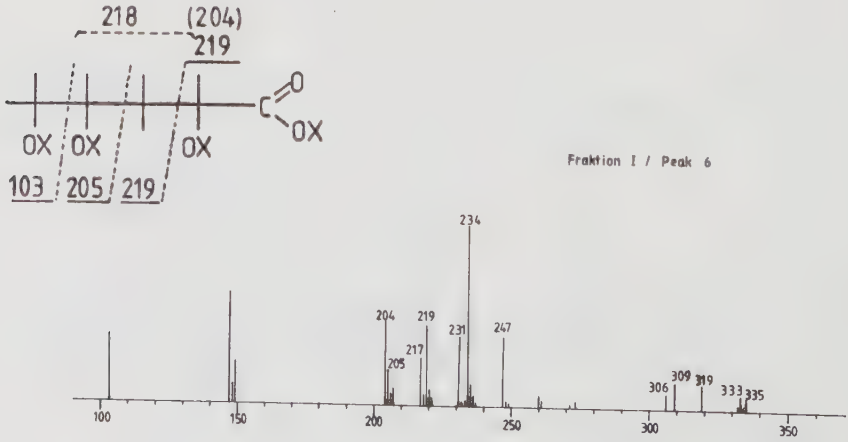


Abb. 90 : Massenspektrum von Peak 6 der Fraktion I

Tab. 32 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 9 aus Fraktion I.

m/e	Fragment-Ion
363	$M^+ - CH_3$
273	$M^+ - HOTMS - CH_3$
260	$M^+ - CH_2OTMS - CH_3$
247	$M^+ - CH_2OTMS - CO$
234	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb. 116)
219	$CH_2OTMS - CHOTMS - CH_2$
218/7	C-3 Fragment
205	$CH_2OTMS - CHOTMS$

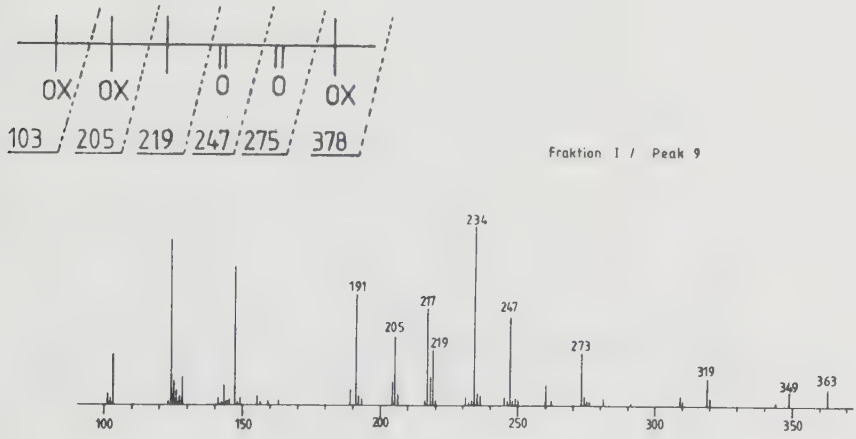


Abb. 91 : Massenspektrum von Peak 9 der Fraktion I

Wie das Fragmentierungsschema zeigt dürfte es sich um eine Zwischenstufe der Saccharinsäurebildung aus Hexosen handeln.

Tab. 33 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 10 aus Fraktion I.

m/e	Fragment-Ion
435	M^+ - HOTMS - CH_3
345	M^+ - $(HOTMS)_2$ - CH_3
332	M^+ - HOTMS - CH_3 - CH_2OTMS
304	M^+ - HOTMS - CH_3 - CH_2OTMS - CO
217	C-3 Fragment
204	CHOTMS - CHOTMS

Es handelt sich um eine Aldohexopyranose.

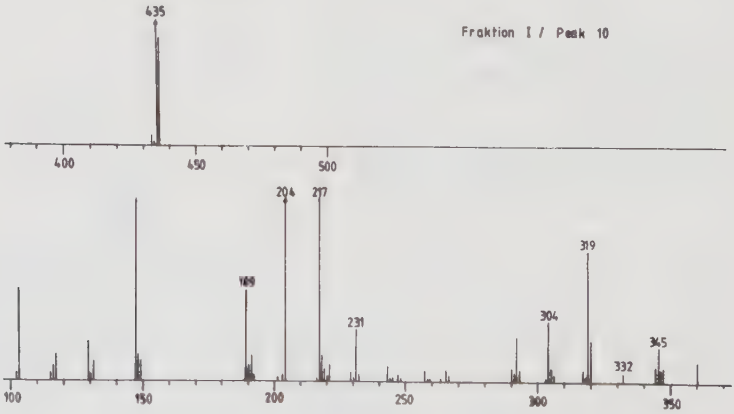
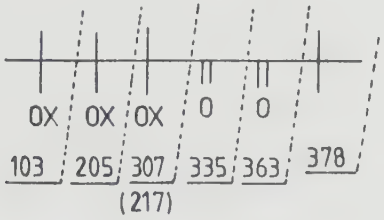


Abb. 92 : Massenspektrum Peak 10 der Fraktion I

Bei Peak 11 der Fraktion I handelt es sich nicht um ein einheitliches Produkt.

Es dürfte ein Gemisch aus der zuvor eluierten Aldohexopyra-

nose bzw. deren anomeren Form und einer offenkettigen Dicarbonylverbindung handeln.



Tab. 34 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 11 aus Fraktion I

m/e	Fragment-Ion
363	$M^+ - CH_3$
335	$M^+ - CH_3 - CO$
307	$M^+ - CH_3 - (CO)_2$
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS
203	CH_2OTMS

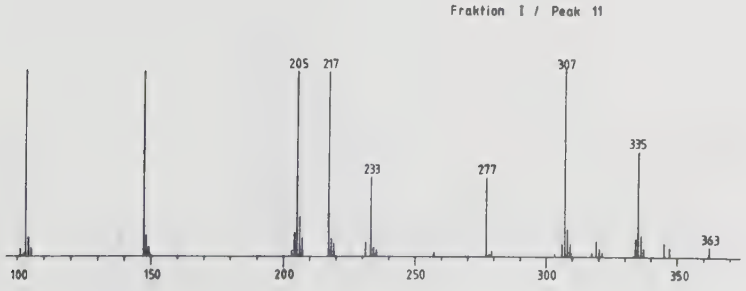


Abb. 93 : Massenspektrum Peak 11 der Fraktion I

Fraktion J

Das Gaschromatogramm dieser Fraktion zeigt eine Anreicherung von ca. 44% einer verzweigten Heptulose-(3), die durch Addition von Dihydroxiaceton an C-1 der Tetrulose entstanden sein dürfte.

Als Nebenprodukte wurden Glucose, Fructose, Arabinose, Xylose und niedere Abbauprodukte gefunden.

Das Auftreten der Masse m/e 537 deutet auf die Abspaltung von HOTMS und CH_3 und damit auf die Molekülmasse m/e 642 hin.

Die weitere succesive Fragmentierung laut Schema und das Fehlen der Masse m/e 204 sind mit der obigen Struktur, einer 5-Hydroxymethyl-hexulose-(3) in Übereinklang.

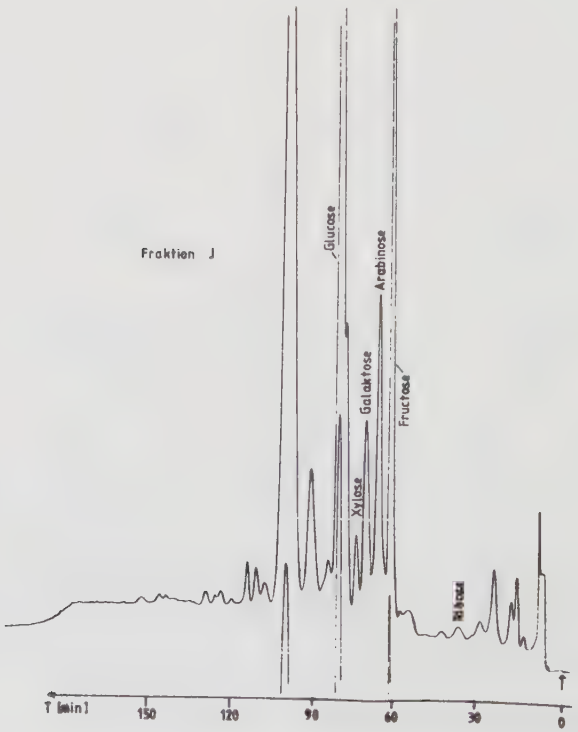


Abb. 94 : Flüssigkeitschromatogramm von Fraktion J

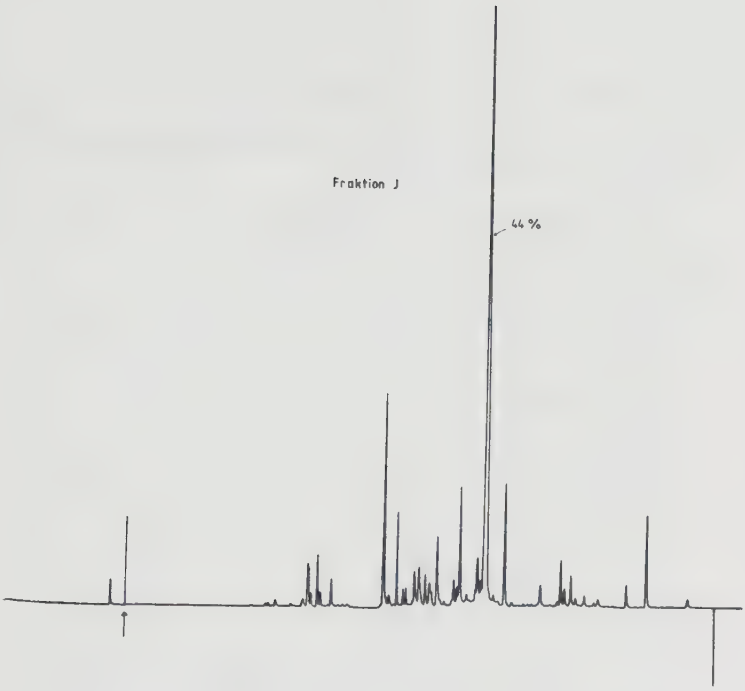


Abb. 95 : GC-Chromatogramm der Fraktion J

Tab. 35 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak a der Fraktion J

m/e	Fragment-Ion
537	M^+ - HOTMS - CH_3
434	M^+ - HOTMS - CH_3 - CH_2OTMS
404	m/e 434 - CH_2O / McLafferty-Umlagerung an offenkettiger Heptulose-(3)
347	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS - HOTMS
319	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS - HOTMS - CO
307	CH_2OTMS - CHOTMS - CHOTMS
245	CH_2OTMS - CHOTMS - CO
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

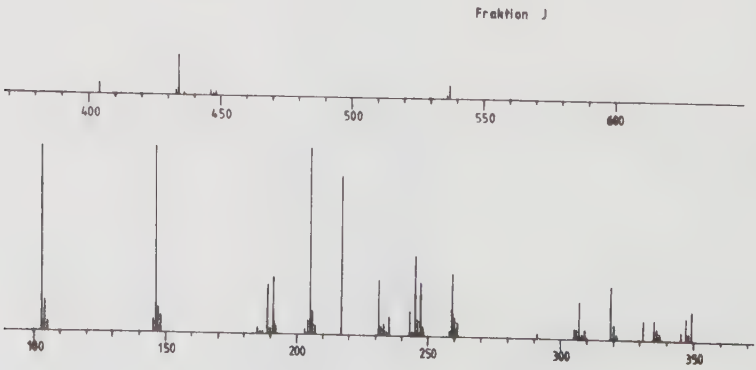


Abb. 96 : Massenspektrum der Fraktion J

Fraktion K

Peak 1, 2, 4, 8, 10, 11 und 12 konnten wegen zu geringer Intensität der Massenspektren nicht zugeordnet werden. Peak 3 zeigt das typische Fragmentierungsschema einer Pentopyranose. Peak 5 dürfte eine offenkettige Hexulose sein, da die Folgefragmente einer McLafferty-Umlagerung bei m/e 306 und 234 sowie die m/e-Werte 437 (M^+- CH_2OTMS), 204/5, 217 und 307 auftreten.

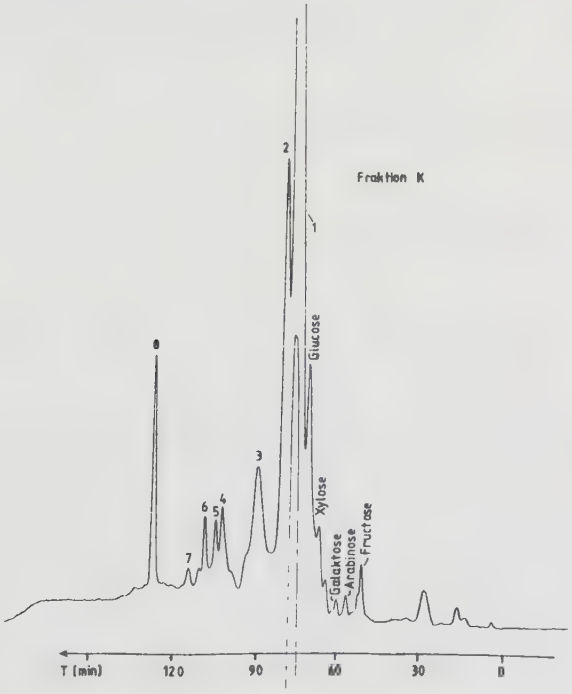


Abb. 97: Flüssigkeitschromatogramm der Fraktion K

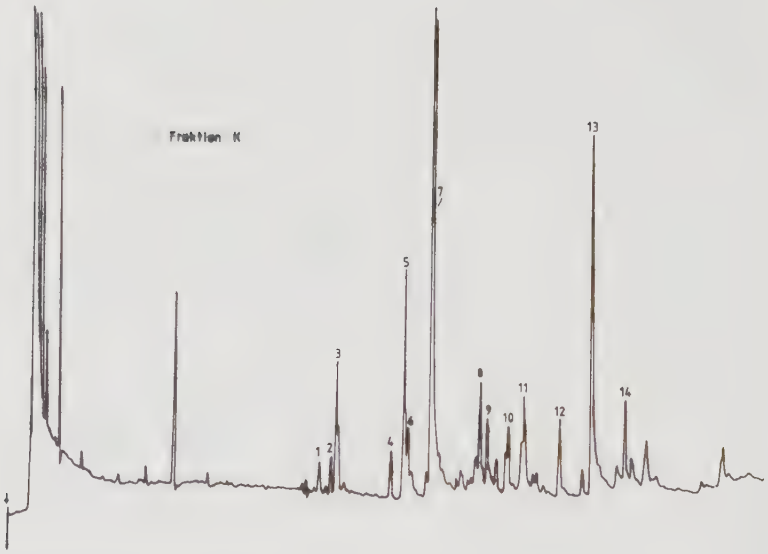


Abb. 98 : GC-Chromatogramm der Fraktion K

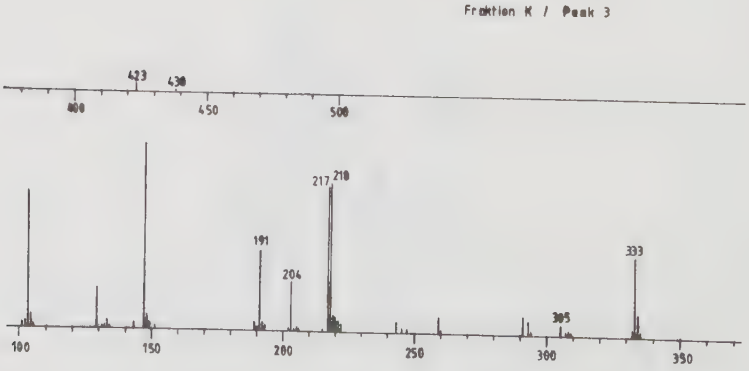


Abb. 99 : Massenspektrum von Peak 3 der Fraktion K

Tab. 36 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 5 der Fraktion K

m/e	Fragment-Ion
437	M^+ - CH_2OTMS
335	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS
307	CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb. 116)
245	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS - HOTMS
234	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb. 116)
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS
204	CHOTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

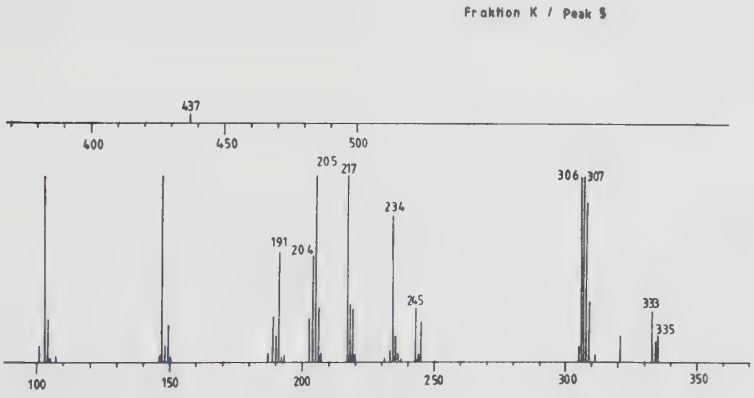


Abb. 100 : Massenspektrum von Peak 5 der Fraktion K

Tab. 37 : Interpretation der wichtigsten Fragmentionen von Peak 7 der Fraktion K

m/e	Fragment-Ion
437	M^+- CH_2OTMS
321	M^+- COOTMS - CHOTMS
307	CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$
245	M^+- CH_2OTMS - CHOTMS - HOTMS
219	COOTMS - CHOTMS
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS
204	CHOTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

Aufgrund der Fragmentierung dürfte es sich um eine Hexometasaccharinsäure handeln, wie aus dem Fragmentierungsschema hervorgeht.

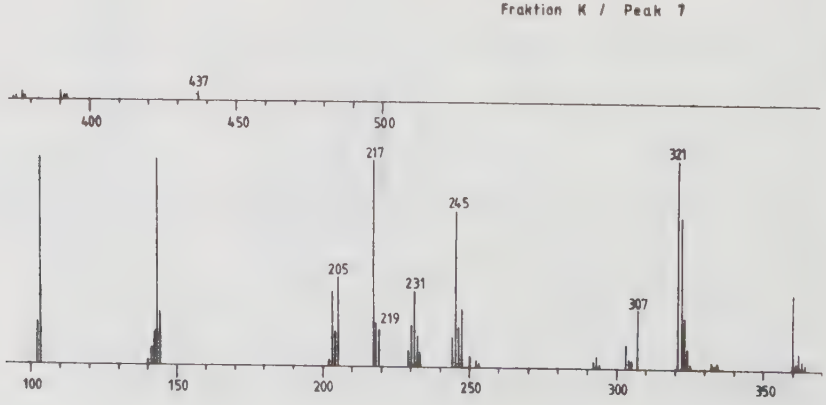


Abb. 101 : Massenspektrum von Peak 7 der Fraktion K

Tab. 38 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 9 der Fraktion K

m/e	Fragment-Ion
437	M^+ - CH_2OTMS
347	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS
335	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS
321	M^+ - COOTMS - CHOTMS
307	CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$
244	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS - CHOTMS
231	M^+ - COOTMS - CHOTMS - HOTMS
217	COOTMS - CHOTMS
205	CH_2OTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

Aufgrund der m/e-Werte sowie durch Vergleich mit der Literatur wird dieser Peak einer Hexoisosaccharinsäure zugeordnet.

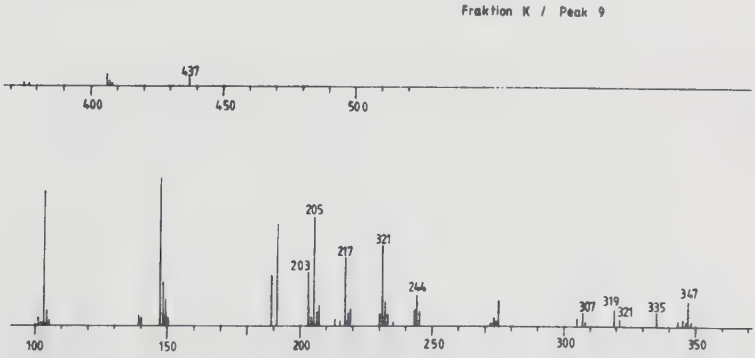


Abb. 102 : Massenspektrum von Peak 9 der Fraktion K

Tab. 39 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 13 der Fraktion K

m/e	Fragment-Ion
552	M^+- HOTMS
537	M^+- HOTMS - CH_3
462	M^+- $(HOTMS)_2$
447	M^+- $(HOTMS)_2$ - CH_3
435	M^+- HOTMS - CH_3 - CH_2OTMS
344	M^+- $(HOTMS)_2$ - CH_3 - CH_2OTMS
307	C-3 Fragment
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt
217	m/e 307 - HOTMS
205	CH_2OTMS - CHOTMS
203	CHOTMS - COTMS
103	CH_2OTMS

Bei Peak 13 handelt es sich um eine offenkettige Heptulose, die an C'-5 eine Hydroxymethylgruppierung trägt.

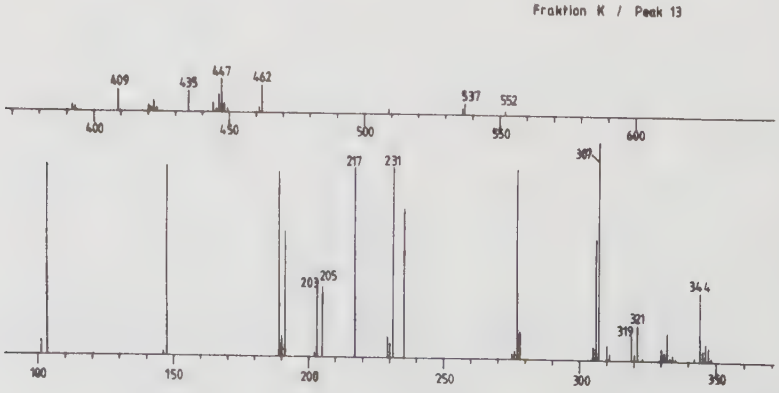


Abb. 103 : Massenspektrum von Peak 13 der Fraktion K

Peak 14: Aufgrund des Massenspektrums und der Retentionsdaten handelt es sich um eine Hexometasaccharinsäure.

Tab.40 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 14 der Fraktion K

m/e	Fragment-Ion
437	M^+- CH_2OTMS
421	M^+- COOTMS
347	M^+- CH_2OTMS - HOTMS
321	M^+- COOTMS - CHOTMS
307	M^+- COOTMS - CHOTMS - CH_2
233	M^+- $(CH_2OTMS)_2$ - COTMS
219	M^+- $(CH_2OTMS)_2$ - CHOTMS - CH_2
217	307 - HOTMS
103	CH_2OTMS

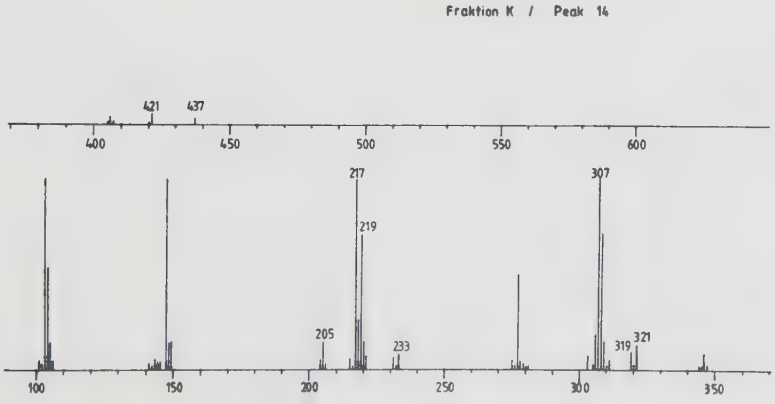


Abb. 104 : Massenspektrum von Peak 14 der Fraktion K

Fraktion L besteht zu ca. 62% aus einer verzweigten Octulose-(3).

Abb. 105 : Flüssigkeitschromatogramm der Fraktion L

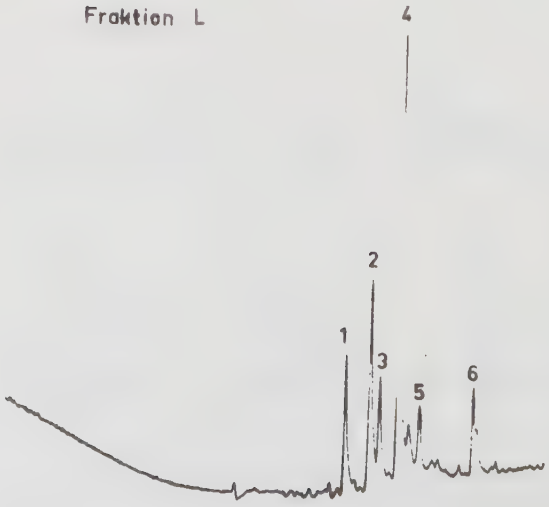


Abb. 106 : GC-Chromatogramm der Fraktion L

Tab. 41 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 4 der Fraktion L

m/e	Fragment-Ion
744	M^+
549	M^+ - $(HOTMS)_2$ - CH_3
437	M^+ - CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$
409	CH_2OTMS - $(CHOTMS)_3$
347	M^+ - CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$ - HOTMS
319	m/e 409 - HOTMS
307	CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb. 116)
245	M^+ - CH_2OTMS - $(CHOTMS)_3$ - HOTMS
234	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb. 116)
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

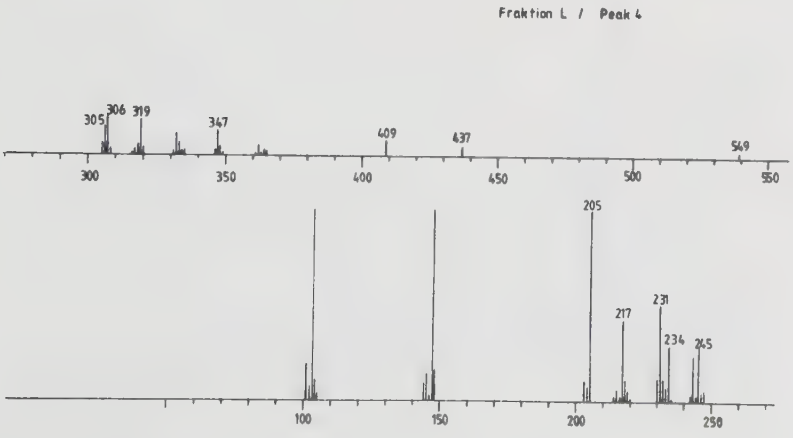


Abb. 107 : Massenspektrum von Peak 4 der Fraktion L

Es handelt sich offensichtlich um ein Kondensationsprodukt zweier Tetrulosen mit anschließender Umlagerung zu Octulose-(4).

Fraktion M

Der Hauptanteil der Fraktion M ist eine Heptulose-(3), die aus der Reaktion von Tetrulose mit Dihydroxiaceton entstanden sein dürfte. Der größte Peak 3 im Gaschromatogramm zeigt im Massenspektrum eine offenkettige Heptulose.

Peak 2 ist eine Aldohexofuranose.

Die anderen Spektren sind aufgrund ihrer geringen Intensität nicht auswertbar.

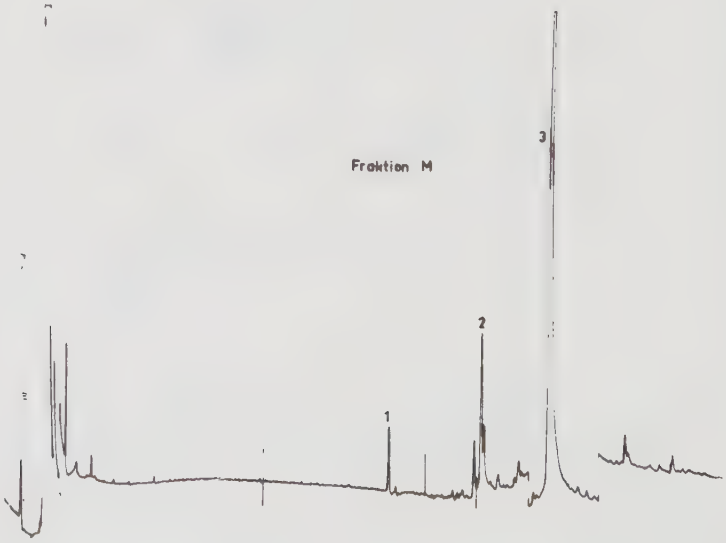


Abb. 108 : GC-Chromatogramm der Fraktion M

Tab. 42 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen von Peak 3 der Fraktion M

m/e	Fragment-Ion
537	M^+ - HOTMS - CH_3
437	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS
434	M^+ - HOTMS - CH_3 - CH_2OTMS
347	m/e 437 - HOTMS
319	C-4 Fragment - HOTMS
307	CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$
245	M^+ - CH_2OTMS - $(CHOTMS)_2$ - HOTMS
217	C-3 Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

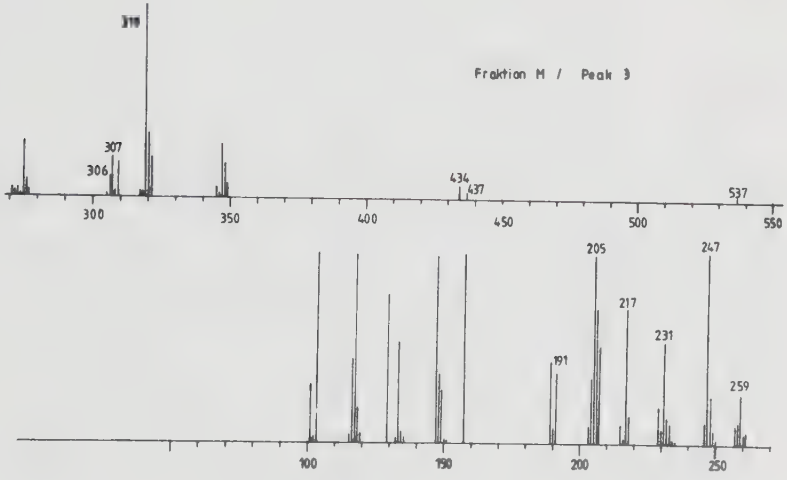


Abb. 109 : Massenspektrum von Peak 3 der Fraktion M

8. Umsetzung von Dihydroxiaceton mit Calciumhydroxid

Dihydroxiaceton reagiert ähnlich wie Formaldehyd (vgl. Kap.3) in alkalischem Milieu (1%-iger $Ca(OH)_2$-Lösung) zu einem Gemisch von Kohlenhydraten und Kohlenhydratabbauprodukten. Man erhält als Hauptprodukt die Dendroketose, eine verzweigtkettige Ketohexose (vgl. Abb. 4).

Bei kurzer Reaktionsdauer treten durch Isomerisierung von Dihydroxiaceton zu Glycerinaldehyd und durch nachfolgende Mischaddition, höhere Zucker auf, hauptsächlich Fructose und Sorbose, die durch weitergehende Isomerisierung in die korrespondierenden Aldosen, hauptsächlich Glucose, übergehen. Bei längerer Reaktionsdauer entstehen, wie schon zuvor erwähnt wurde, Saccharinsäuren (Abb. 4). Bislang ist die Dendroketose nicht in kristalliner Form erhalten worden. Die Reindarstellung wird mit einem verteilungschromatographischen Trennverfahren durchgeführt. Das Rohproduktgemisch wird auf eine Säule (2,5 x 200 cm), die mit einem stark sauren Ionenaustauscher (DOWEX 50 WX 8, 200-400 mesh), der zuvor in die Lithiumform überführt wurde, aufgetragen. Die Elution erfolgt mittels 85%-igem Ethanol (Abb.110).

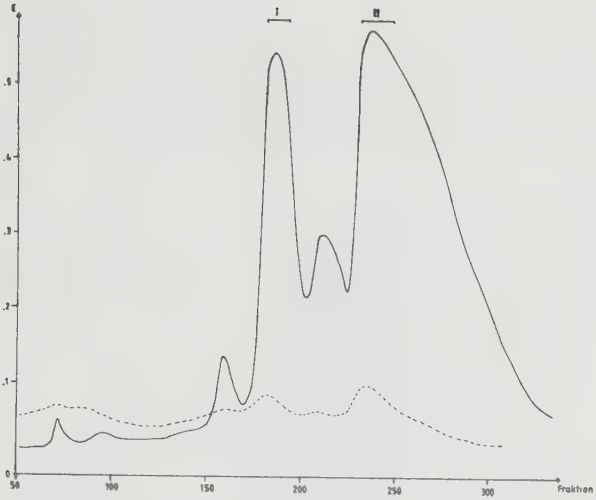


Abb. 110 : Verteilungschromatographie an stark saurem Ionenaustauscher DOWEX 50WX8, 200-400 mesh, Li-Form
Probe: Rohprodukt Dendroketose

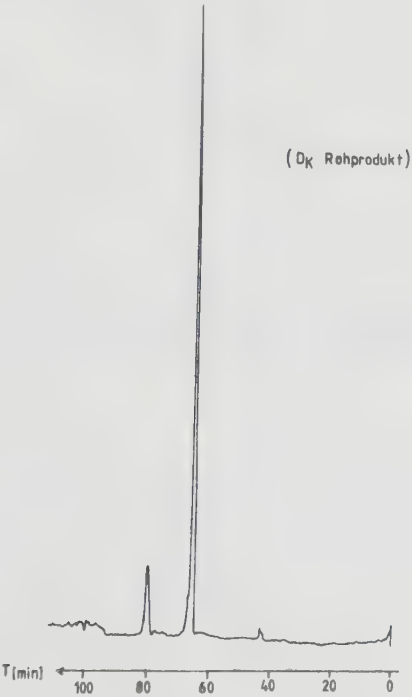


Abb. 111 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator)
Rohprodukt von Dihydroxiaceton in 1%-iger $Ca(OH)_2$, N_2 bei 25 °C

Die gewonnenen Fraktionen werden mit dem Zuckeranalysator zur Bestimmung des Zuckergehaltes untersucht. Die Abb.112 und 113 zeigen die Chromatogramme der isolierten Fraktionen.

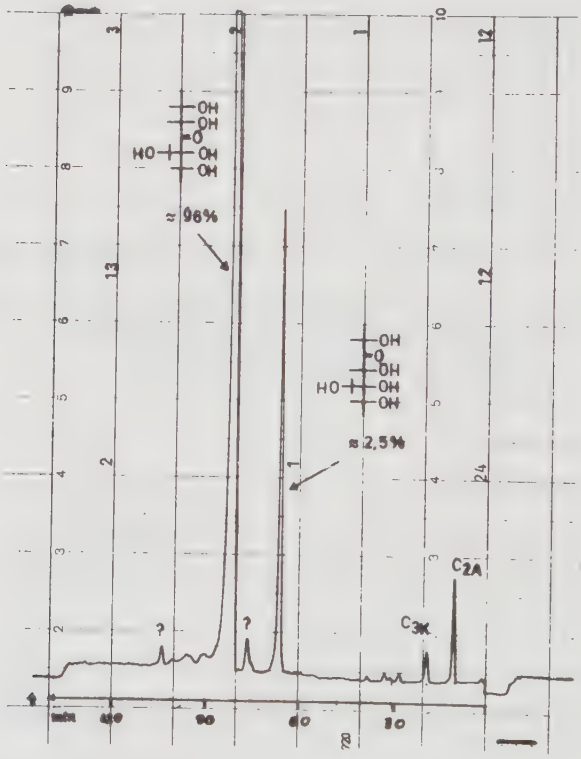


Abb. 112 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) von Fraktion I

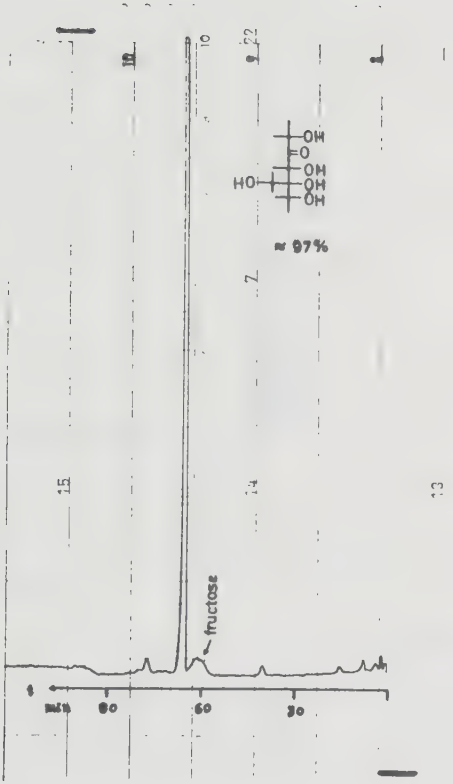


Abb. 113 : Flüssigkeitschromatogramm (Zuckeranalysator) von Fraktion II

Vor Fraktion I werden nicht umgesetztes Dihydroxiaceton und Glycerinaldehyd sowie niedere Rückspaltungsprodukte eluiert. Zwischen der Fraktion I und II werden entstandene nicht verzweigte Aldo- und Ketohexosen gefunden.

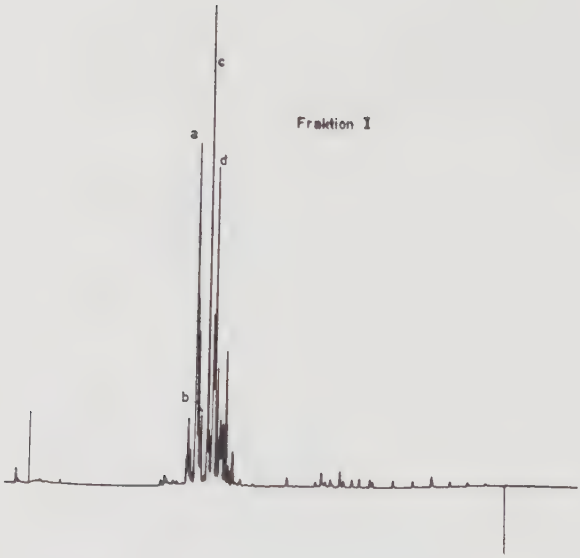


Abb. 114 : GC-Chromatogramm von Fraktion I

Während Dendroketose mit über 97%-iger Reinheit als farbloses Öl isoliert werden konnte, konnte die isomere 3-Keto-Verbindunge nur mit geringerer Reinheit gewonnen werden.
Außerdem neigt diese offensichtlich zur Umlagerung in die stabilere Dendroketose und zu Rückspaltungen zu Glykolaldehyd, Glycerinaldehyd, Dihydroxiaceton und evtl. verzweigten Tetrosen.
Die Struktur der beiden Hexosen wurde durch NMR und GC-MS gesichert[10,49].
Nach der Überführung der beiden Fraktionen in per-Trimethylsilyl-Derivate wurden sie mittels GC-MS untersucht[38-44].

Die Abb. 114 und 115 zeigen die erhaltenen Gaschromatogramme. Fraktion I besteht mehrheitlich aus einem Gemisch verzweigtkettiger Hexosen, die offenkettig oder in der Furanose- bzw. Pyranose-Form vorliegen. Hauptbestandteil ist die als Peak c bezeichnete verzweigte Hexulose-(3).
Die auftretenden Fragment-Ionen der wichtigsten Komponenten sind in den Tabellen 43 bis 49 zusammengefaßt.

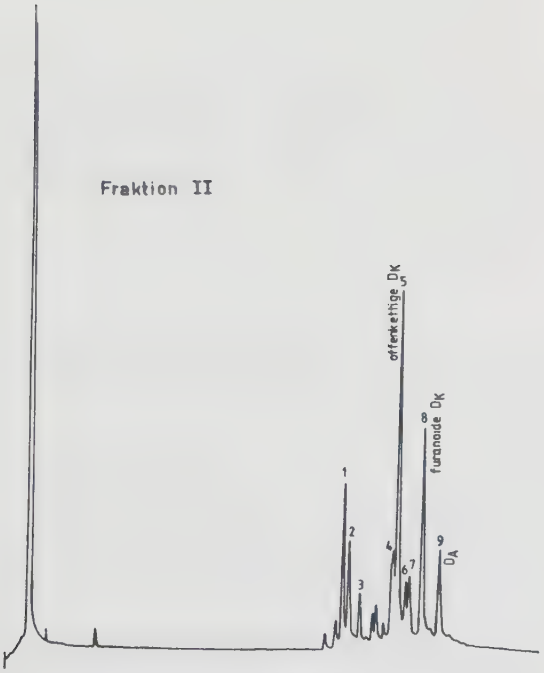


Abb. 115 : GC-Chromatogramm von Fraktion II

Tab.43 :

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen des Peaks a der Fraktion I.

m/e	Fragment-Ion
347	M^+-CH_2OTMS - HOTMS
245	M^+- $(CH_2OTMS)_2$ - OTMS
217	C-3 - Fragment mit zwei OTMS-Gruppen
205/4	tritt nicht auf

Das Auftreten der Masse 347 deutet auf eine Ketohexose hin, die wegen dem Auftreten der Masse 245 verzweigt sein dürfte. Wo der Verzweigungsort ist, kann allerdings nicht eindeutig festgelegt werden.

Tab.44 :

Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen des Peaks b (Dendroketose) der Fraktion I.

m/e	Fragment-Ion
437	M^+- CH_2OTMS
347	M^+- CH_2OTMS - HOTMS
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb.116)
234	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb.116)
217	C-3 Fragment (mit zwei OTMS-Gruppen)
103	CH_2OTMS

Aufgrund der Retentionszeit und der massenspektroskopischen Daten handelt es sich hierbei um Dendroketose.
(vgl. Peak a, Fraktion II).

Tab.45 :

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen des Peaks c der Fraktion I.

m/e	Fragment-Ion
435	M^+- HOTMS - CH_3
332	M^+- HOTMS - CH_3 - CH_2OTMS
320	M^+- CH_2OTMS - CHOTMS - CH_3
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt(vgl. Abb.116)
293	TMSO - CH_2 - $C^+<^{OTMS}_{OTMS}$
243	M^+- HOTMS - CH_3 - CH_2OTMS - OTMS
217	C-3 - Fragment
205	CH_2OTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

Aufgrund dieser Daten (vgl. Abb. 115 a) und des chromatographischen Verhaltens dürfte es sich hierbei um eine verzweigte Hexulose-(3) handeln, der isomeren Form zu Dendroketose.
Die Masse 205 deutet auf eine endständige Glykol-Gruppierung hin, während das Fehlen der Masse 204 eine Anwesenheit eines mittelständigen Glykolpaares ausschließt. Die Abspaltung einer OTMS-Gruppierung (Masse 332 zu 243) spricht für ein tertiäres C-Atom, was mit der vorgeschlagenen Struktur übereinstimmt.

Tab.46 :

Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen des Peaks d der Fraktion I

m/e	Fragment-Ion
435	M^+ - HOTMS - CH_3
347	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS
320	M^+ - CH_2OTMS - CHOTMS - CH_3
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb. 116)
293	TMSO - CH_2 - $C^+\lesssim^{OTMS}_{OTMS}$
243	M^+ - HOTMS - CH_3 - CH_2OTMS - OTMS
217	C-3 - Fragment
205	CH_2CTMS - CHOTMS
103	CH_2OTMS

Es dürfte sich hierbei um eine stereoisomere Form zu der als Peak c eluierten Hexulose-(3) handeln, da die Massenspektren sich - abgesehen von geringfügigen Intensitätsunterschieden- gleichen.

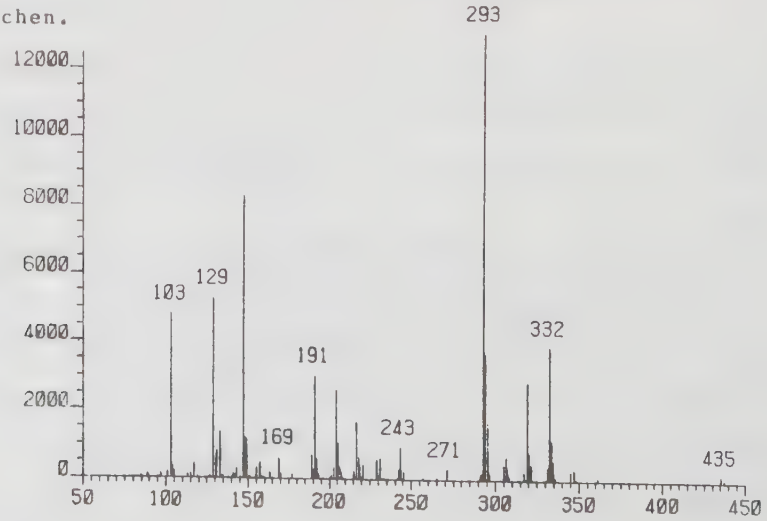


Abb. 115a: MS - Chromatogramm der Fraktion I / c

Fraktion II zeigt im Zuckeranalysator eine Reinheit von über 97% (bezogen auf Zuckergehalt) an Dendroketose (vgl. Abb.113) Nach der per-Trimethylsilylierung zeigt sich jedoch ein diffuses Bild im Gaschromatogramm. Da je Komponente jedoch mehrere Derivate, α- und ß-Formen, Furanosen und Pyranosen sowie offenkettige Formen möglich sind, ist dies nicht verwunderlich.
Im Einzelnen sollen nur die wichtigsten Peaks diskutiert werden.

Tab.47 :

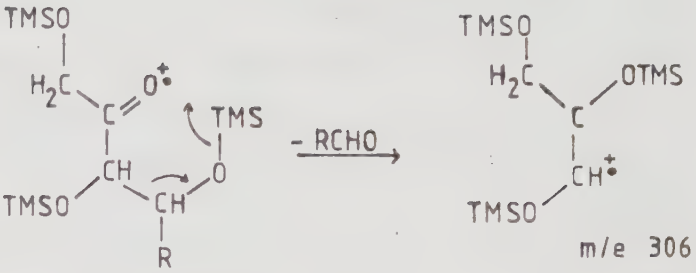
Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen des Peaks 5 der Fraktion II.

m/e	Fragment-Ion
437	$M^+ - CH_2OTMS$
347	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS
334	$M^+ - (CH_2OTMS)_2$
319	$M^+ - CH_2OTMS$ - HOTMS - CO
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb.116)
234	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb.116)
217	C-3 - Fragment
103	CH_2OTMS

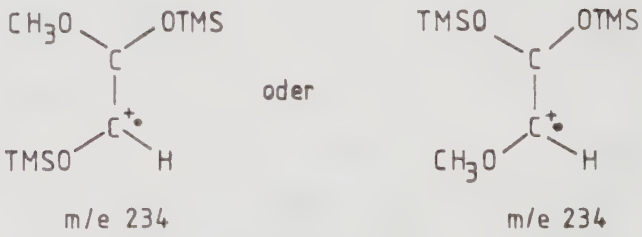
Offenkettige α,ß-Dihydroxy-aldehyde und Ketosen sollten McLafferty-Umlagerungen zeigen.[41)]

Die Bildung des m/e Peaks 306 könnte folgendermaßen verlaufen:

Abb. 116



Der Peak bei m/e 234 ist das Produkt einer normalen McLafferty-Umlagerung.



Das Auftreten von m/e 437 spricht für eine α-ständige, m/e 334 für das Vorhandensein wenigstens einer weiteren freien Hydroxymethylgruppe. m/e 306 und m/e 234 lassen auf ein offenkettiges α,ß-Hydroxycarbonyl schließen.

Das Fehlen von m/e 205/4 sowie der errechnete M-Wert von 540 deuten auf eine verzweigte Hexulose-(2) hin. Die Verzweigung kann nur an C-4 sein, da sonst ein intensiver Peak bei m/e 205 hätte auftreten müssen. Die vorgeschlagene Struktur ist mit Dendroketose identisch.

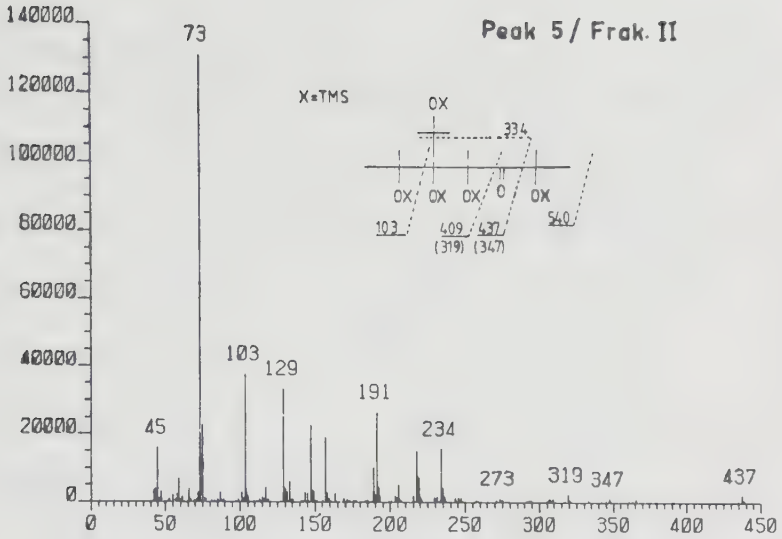


Abb. 117 : Massenspektrum von Peak 5 der Fraktion II

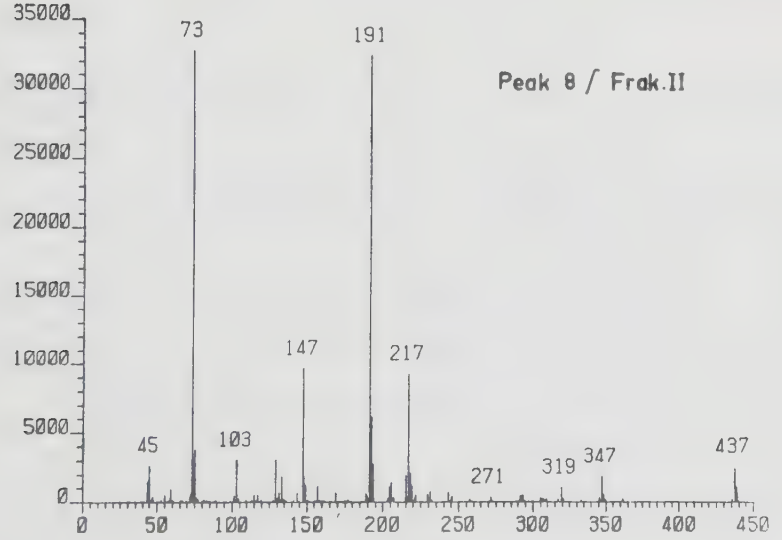


Abb. 118 : Massenspektrum von Peak 8 der Fraktion II

Tab. 48 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen des Peaks 8 der Fraktion II

m/e	Fragment-Ion
437	M^+ - CH_2OTMS
347	M^+ - CH_2OTMS - HOTMS
334	M^+ - CH_2OTMS - CH_2OTMS
217	C-3 Fragment
103	CH_2OTMS

m/e 437 zeigt eine Ketohexose an (vgl. Abb. 118), die aufgrund der Masse m/e 334 eine weitere endständige Hydroxymethyl-Gruppe besitzt. Das Fehlen der Masse m/e 306 und 234 läßt eine offenkettige Form ausschließen. Es dürfte sich um eine furanoide Form der Dendroketose handeln.

Tab. 49 : Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen des Peaks 9 der Fraktion II

m/e	Fragment-Ion
435	M^+ - HOTMS - CH_3
347	M^+ - HOTMS - CH_2OTMS
319	M^+ - HOTMS - CH_2OTMS - CO
306	McLafferty-Umlagerungsprodukt (vgl. Abb. 116)
217	C-3 Fragment
103	CH_2OTMS

Der intensive Peak bei m/e 306 (vgl. Abb. 119) sowie das Auftreten von m/e 407 bzw. 319 machen es wahrscheinlich, daß es sich um eine isomere Form der Dendroketose handelt.
Die succesive Abspaltung von CO (m/e 435 zu 407 bzw. m/e 347 zu 319) sowie das Fehlen von Glycol-Fragmenten unterstützen diese Interpretation.

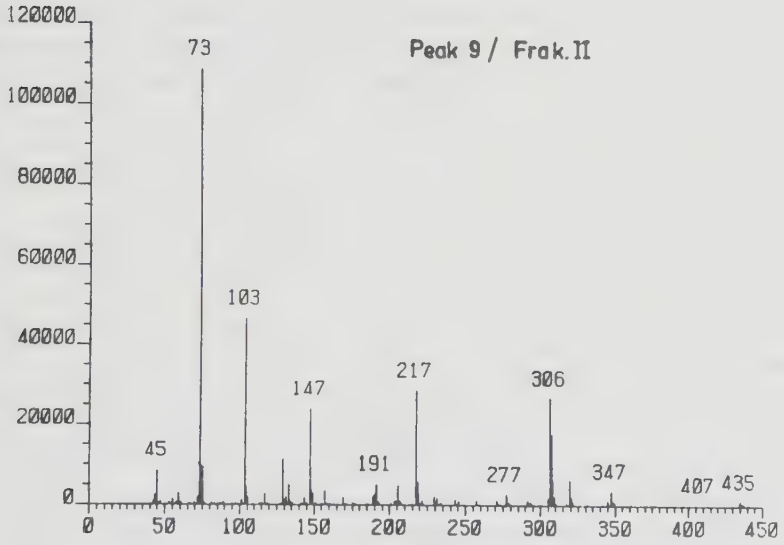


Abb. 119 : Massenspektrum von Peak 9 der Fraktion II

9. Diskussion

Die bei der Formose-Reaktion auftretenden Zwischen- und Endprodukte konnten erstmals weitgehend sowohl analytisch als auch präparativ aufgetrennt und untersucht werden. Von früheren Autoren[10,48] wurden diese Ergebnisse zum Teil postuliert, der Nachweis war jedoch in keinem Fall gelungen. Aufgrund der verbesserten Analytik gelang es zum ersten Mal, eine Gesamtkinetik aufzustellen, bei der bis zu 70 % des Gesamtansatzes erfaßt sind. Nur eindeutig zugeordnete Komponenten wurden aufgenommen. Bei einer Gesamtzahl von ca. 90 Komponenten läßt sich eine Gesamtkinetik nur schlecht graphisch darstellen. In Abb. 120 ist deshalb eine vereinfachte Kinetik abgebildet. Alle eindeutig zugeordneten Komponenten sind entsprechend der Anzahl von Kohlenstoffatomen im Molekül zusammengefaßt.

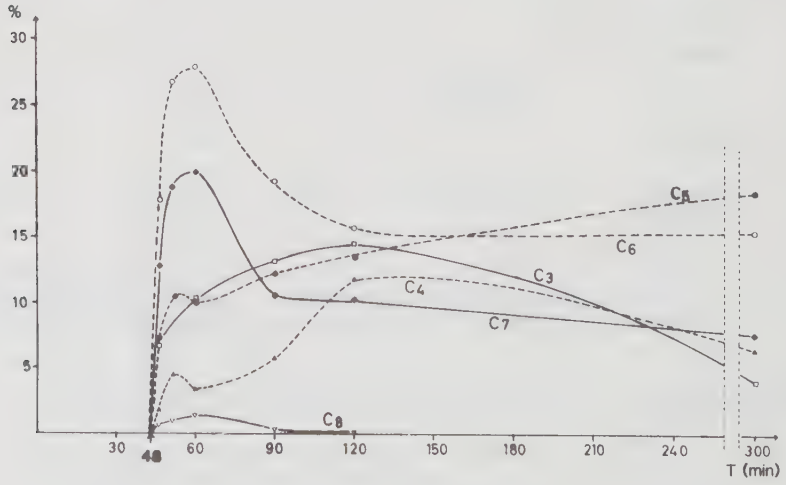


Abb. 120 : Vereinfachtes Konzentrations-Zeit-Diagramm der quantitativ auswertbaren Produkte der Formose-Reaktion. Die Komponenten sind entsprechendderAnzahl ihrer Kohlenstoffatome zusammengefaßt.
Reaktionsbedingungen: 38 %-ige Formaldehydlösung (46,4 ml) + 6 g $Ca(OH)_2$ ad 600 ml dest. H_2O gelöst, bei 50 °C (thermostatisiert). (Siehe auch Teil II,3)

Das Ergebnis bestätigt frühere Arbeiten[10,12], erfaßt aber erstmals auch den Anteil an C-7- und C-8-Komponenten. Vor allem das Auftreten höherer Zucker, wie Heptosen und Oktosen, aber auch von verzweigtkettigen Hexosen, Heptosen und Oktosen deckt sich bestens mit früheren Postulaten[12]. Höhere etozucker, besonders aber verzweigte, neigen in verstärktem Maße zurEndiolatbildung, was auch durch ihre sehr späte Elution im Zuckeranalysator, auf einem stark basischen Ionenaustauscher bestätigt wird. Gerade solche Endiolatbildner sind aber bevorzugte Co-Katalysatoren bei der Autokatalyse der Formose-Reaktion. Die experimentellen Ergebnisse sowie die der analytischen Untersuchungen lassen keinen Zweifel an dieser Annahme. Unterstützt werden diese Annahmen auch durch das Auftreten von offenkettigen Heptulosen-(3)und Oktulosen-(3)sowie Oktulosen-(4) in den Massenspektren. Vor allem eine zusätzliche Verzweigung scheint die Ausbildung furanoider oder pyranoider Systeme bei solchen höheren Zuckern noch zusäztlich zu erschweren. Offenkettige oder zumindest weitgehend offenkettige α-hydroxycarbonyle neigen bekanntlich in alkalischem Milieu verstärkt zu Endiolat-Bildung[12], was die besondere Rolle dieser Substanzklasse bei der Formose-Reaktion unterstreicht.
Erstmals gelingt es eine umfassende Zusammenstellung der bei der Weiterreaktion der Formose entstandenen Umlagerungs- und Abbauprodukte aufzustellen. Neben der Lobry de Bruyn - Alberda von Ekenstein - Umlagerung, die über die Endiolat-Bildung zu isomeren Kohlenhydraten führt, spielt hierbei der Reaktionsweg über β-Eliminierung und Bildung intermediärer Diketone zu Umlagerungs- und Spaltprodukten offentsichtlich eine gewichtige Rolle. Solche Diketone sind natürlich auch bevorzugte Partner für Carbonylreaktionen mit C-H-aziden Verbindungen, wobei dieser Teilaspekt jedoch weniger berücksichtigt wurde.

Die Bildung von Saccharinsäuren nach diesem Mechanismus konnte eindeutig verfolgt werden, was auch in Teilreaktionen (vgl. Teil I,2) bestätigt wurde. Nach diesen Schema werden Kohlenhydrate, die durch die Formose-Reaktion gebildet wurden, relativ rasch zu Saccharinsäuren umgelagert, die unter den Reaktions-

bedingungen weitgehend stabil sind. Daneben findet nach Bildung der Endiolate eine Rückspaltung, vor allem höherer Zucker, statt (vgl. Teil I, 2). So läßt sich auch zwanglos das rasche Verschwinden derhöheren Zucker (Heptosen, Oktosen) erklären. Ferner dürften auf diese Weise niedere Kohlenhydrate aus Hexosen und Pentosen in alkalischem Milieu entstehen. Dieser Anteil ist natürlich nur schwer nachzuweisen, da die Spaltprodukte mit weiteren reaktionsfähigen Komponenten des Gemisches weiterreagieren können.

Bei allen durchgeführten Versuchen wird eine Bevorzugung eines Transadditionsmechanismus beobachtet. Xylose, die eine all-trans Konfiguration besitzt, ist bei allen duchgeführten Versuchen der häufigste Zucker. Die Stabilisierung dieses Zuckers durch Bildung einer stabilen all-äquatorialen OH - Pyranose und der dadurch erschwerten Rückspaltungsreaktionen dürfte eine zusätzliche Rolle spielen. So werden zum Beispiel auch nicht die all-trans Hexose (Idose) bzw. deren isomere Ketohexose (Sorbose) sondern Glucose / (Fructose) als Hauptanteil der entstandenen Hexosen gefunden. Glucose besitzt lediglich im Pyranosering eine all-äquatoriale Konformation, die Hydroxylgruppen an C-4 und C-5 sind aber ständig. Das heißt, daß entweder eine thermodynamisch kontrollierte Reaktion ablaufen oder eine rasche Umlagerung erfolgen muß.
Das sehr schnell Auftreten von Fructose und Glucose spricht aber für einen Additionschritt zweier Triosen, nähmlich Dihydroxiaceton und Glycerinaldehyd zu Fructose und anschließende Umlagerung zu Glucose (und Mannose) über die Lobry de Bruyn-Alberda von Ekenstein-Umlagerung. Unter diesen Bedingungen wäre auch die Bildung der C-4 / C-5-cis Konfiguration zwanglos zu erklären. Da die Triosen jedoch Konkurrenzreaktion mit Formaldehyd und Glycolaldehyd sowie Tetrosen eingehen können, ist die Bildung von nicht verzweigten Hexosen je nach Reaktionsverlauf (Formaldehydkonzentration usw.) zu Beginn der Reaktion mehr oder weniger untergeordnet und spielt erst im weiteren Verlauf der Reaktion eine entscheidende Rolle. Hierbei dürftenRückspaltungen und anschließenden Aufbaureaktionen der Spaltprodukte untereinander die entscheidenden Reaktionen sein.

Experimenteller Teil

1. Bestimmung der Formaldehydkonzentration

1.1. Konzentration der Formaldehydlösung

Die Konzentration des Formaldehyds in Lösung wird mercurimetrisch bestimmt[13].

Folgende Lösungen werden angefertigt:

a) 0,1 N KCN-Lösung: Titration mit 0,1 N $AgNO_3$ bis eine Trübung bleibt. (Methode nach Liebig)

b) 0,1 N $Hg(NO_3)_2$-Lösung; diese wird mit Lösung a) eingestellt.

c) Indikatorlösung:
1 g Diphenylcarbazon wird in 100 ml Methanol gelöst.

Arbeitsvorgang:
Zu der wässrigen Formaldehydlösung wird 0,1 N KCN-Lösung (5 ml für je 100 mg Aldehyd) zugegeben.
Nach Zugabe von 6-8 Tropfen Indikatorlösung wird die Lösung mit 0,2 N HNO_3-Lösung soweit angesäuert bis die Farbe der Lösung gerade verschwindet (farblos). Sofort wird die farblose Lösung mit der eingestellten $Hg(NO_3)_2$-Lösung zurücktitriert. Der Umschlagspunkt ist erreicht, sobald eine Violettfärbung aufgetreten ist und mindestens 1 min lang be-

stehen bleibt.

1 ml verbrauchter 0,1 N KCN-Lösung entspricht 3,00 mg Formaldehyd.

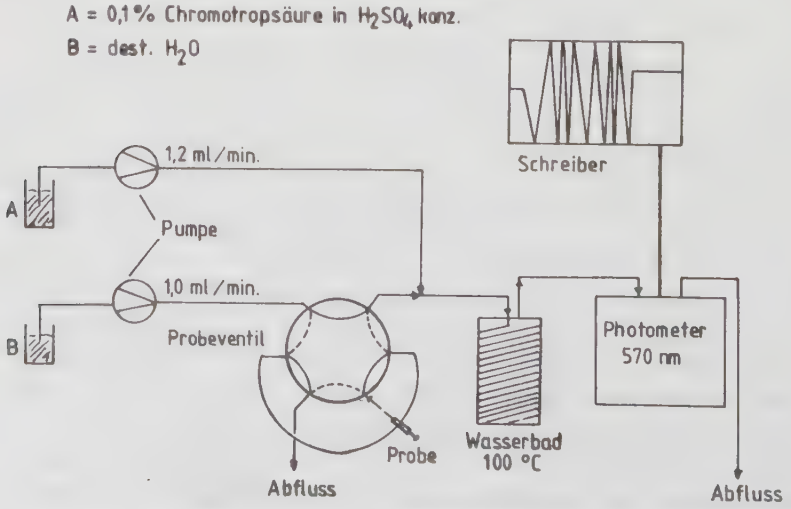
Die für diese Untersuchungen verwendete Formaldehydlösung (mind. 35%, MERCK) wird nach mehrmaligen Bestimmungen als 38,8%-ige Lösung bestimmt.

1.2. Bestimmung der Formaldehydkonzentration in den Reaktionsprodukten

Farbreagenz: Chromotropsäure

0,55 g Chromotropsäure (= 1%-ige Lösung) wird in 300 ml konzentriertes H_2SO_4 gelöst.

Zur Bestimmung des Verbrauchs der Formaldehydkonzentration bei der Formose-Reaktion, wird die Chromotropsäure als Farbreagenz in dem Zuckeranalysator eingesetzt.



Formaldehyd reagiert nach Erwärmung im Wasserbad unter Bildung einer violetten Farbe, die bei 570 nm gemessen wird.

2. Umsetzung von Formaldehyd mit Alkalimetall (Li, Na, K)-hydroxiden

23,2 ml an 0,5 Mol/l Formaldehydlösung und 576,8 ml an 0,5 N Alkalimetallhydroxidlösung (LiOH, NaOH, KOH) werden unter Stickstoffatmosphäre bei 60° C (bzw. 70, 80, 90° C) im Reaktionsgefäß (Abb. 3) zur Reaktion gebracht. Ein pH-Meter und ein Schreiber werden zusätzlich angeschlossen, damit der Reaktionsverlauf kontrolliert werden kann.
In bestimmten Zeitabständen werden Proben (je 5 ml) aus dem Reaktionsgefäß entnommen, die dann mit 0,1 N HCl acidimetrisch titriert werden, um die Säurebildung zu bestimmen. Außerdem werden zusätzlich je 0,5 ml Proben entnommen, die sofort mit 4,5 ml 0,1 N Borsäure neutralisiert werden. Diese Proben werden für die Produktverteilung mit Hilfe des Zuckeranalysators verwendet.
Der Verbrauch an Formaldehydkonzentration erfolgt über photometrische Messungen (bei 570 nm). Eine 0,1%-ige Chromotropsäure/H_2SO_4-Lösung dient als Farbreagenz.

3. Darstellung der Formose-Reaktion (Zwischen- und Endprodukte)

In einem speziell angefertigten Reaktionsgefäß (vgl. Abb. 3) werden 6 g $Ca(OH)_2$ in 553,6 ml dest. H_2O gelöst. Sobald die Lösungstemperatur erreicht ist (50° C, thermostatisiert), wird 46,4 ml 38%-ige Formaldehydlösung zugegeben. Die ganze Reaktion wird unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

Zu bestimmten Zeiten werden Proben, je 25 ml, aus dem Reaktionsgefäß entnommen, die sofort mit einer 10%-igen Oxalsäurelösung neutralisiert werden (pH 5,0 - 6,0). Damit wird eine weitere Reaktion ausgeschlossen. Folgende Probeabnahmen werden durchgeführt: nach 15, 20, 30, 40, 48, 50, 53, 60, 90, 120 min, 5 h und 24 h.
Nach genau 49 min ist ein Farbumschlag von farblos zu gelb zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Übergangsphase von der Cannizzaro-Reaktion zur Formose-Reaktion.

Nach der Neutralisierung werden die Proben über eine G 5-Fritte abfiltriert und anschließend im Vakuum (Rotationsverdampfer) bis zur Trockene eingeengt.

4. Darstellung von Dendroketose

10 g Dihydroxiaceton (C_{3K}) werden in 100 ml dest. H_2O gelöst. Zu der klaren Lösung gibt man 1 g $Ca(OH)_2$ als Katalysator zu. Nach kurzer Zeit (ca. 10 min) wird die Lösung tiefgelb und es wird sofort mit einm feinen Filter abfiltriert. Das gelbe Filtrat wird sogleich mit 7,5%-iger Oxalsäurelösung oder Ionenaustauscher DOWEX 50 WX 8 (H^+-Form) neutralisiert und dann nochmals abfiltriert. Anschließend wird die Lösung vorsichtig im Vakuum eingeengt bis ein gelbes sirupöses Produkt zurückgeblieben ist. Das Rohprodukt enthält ca. 80-90% Dendroketose.

5. Darstellung von D-Glucoisosaccharinsäure

Eine Lösung von Maltosemonohydrat 1,75 g in 250 ml 0,04 N Calciumhydroxidlösung (≙ 0,3 g / 100 ml H_2O) wird bei 25° C, 3,5 h unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Danach wird die Lösung mit CO_2-Gas gesättigt und anschließend abfiltriert. Das Filtrat wird mit DOWEX 50 WX 8 (H^+-Form) neutralisiert, eingeengt bis ca. 20 ml. Dann wird DOWEX 1 x 4 (CO_3^{2-}-Form) zugegeben und über Nacht langsam gerührt. Schließlich wird das Harz mehrmals mit dest. H_2O gewaschen und anschließend mit 1 N NH_3-Lösung eluiert. Die ganzen Proben fallen als farbloses Öl an, das direkt für die Zuordnung im Zuckeranalysator verwendet wird.

6. Darstellung von D-Glucometasaccharinsäure

a. Darstellung von 1,2; 5,6-O-Diisopropyliden-α-D-glucose

10 g Glucose wird in 50 ml Aceton + 50 ml 2,2-Dimethoxipropan und wenig p-Toluolsulfonsäure (als Katalysator) bei 35° C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion (mit Dünnschichtchromatographie geprüft) wird die Lösung mit K_2CO_3-Lösung neutralisiert und dann eingeengt. Umkristallisierung erfolgt mit Essigester/Petrolether (50-70° C)

Schmelzpunkt: 107 - 109° C (Lit.)
106° C (gemessen)

Elementaranalyse:

ber.	C = 55,38%	H = 7,69%
gef.	a) C = 55,80%	H = 8,18%
	b) C = 55,54%	H = 8,15%

Laufmittel für Dünnschichtchromatographie:

$CHCl_3$: EtOH = 90 : 10

Sprühreagenz: $FeCl_3$ / Orcin / H_2SO_4 ("MERCK"-Broschüre)

b. Darstellung von 3-O-Benzyl-glucose

4,0 g 1,2; 5,6-Diisopropyliden-glucose werden in 20 ml Benzylchlorid gelöst. Die Lösung wird unter Rühren und Rückflußkühler auf 100° C erhitzt, während 10 g KOH-Pulver portiosnweise zugegeben und das ganze Produkt in Chloroform aufgenommen wird. Anschließend werden Chloroform und Benzylalkohol im Vakuum abdestilliert.
Das Rohprodukt (3-O-Benzyl-diisopropyliden-glucose) bleibt als Sirup zurück, wird weiter mit 90%-iger Essigsäure zu 3-O-Bn-glucose hydrolisiert und danach mehrmals mit Toluol gewaschen. (Bn = Benzyl)

Ausbeute: 2,1 g

Schmelzpunkt: 138 - 141° C
D^{20} = +20,3 } Lit.

127 - 128° C
D^{20} = +24,1 } gef.

Elementaranalyse:

ber.	C = 57,49%	H = 7,01%
gef.	C = 57,77%	H = 7,13%

c. Darstellung von D-Glucometasaccharinsäure

0,3 g 3-O-Bn-glucose werden in 55 ml 0,04 N $Ca(OH)_2$-Lösung bei 25° C unter Stickstoffatmosphäre ca. 24 h gerührt. Das Umsetzungsprodukt wird an dem Zuckeranalysator gemessen. (Bn = Benzyl)

7. Präparative Trennung mit der Flüssigkeitschromatographie

Das Dendroketose-Rohprodukt wird flüssigkeitschromatographisch über einen Ionenaustauscher, Trennharz DOWEX 50 WX 8, 200-400 mesh, präparativ getrennt.
Der Austauscher wurde zuvor mit destilliertem Wasser, dann mit 2 N HCl-Lösung aufgeschlämmt. Anschließend wird er in eine Flüssigkeitschromatographiesäule 200 x 2,6 cm i.D. gefüllt. Dann wird das Harz mit 10%-iger Lithiumchloridlösung bis neutral äquilibriert und anschließend nochmals mit ca. 2-3 Liter destilliertem Wasser gewaschen.
3 g des Dendroketose-Rohproduktes werden in wenig destilliertem Wasser gelöst und dann auf die Säule aufgetragen.
Zuerst wird mit 90%-iger und am Schluß mit 85%-iger Ethanollösung eluiert. Ein Refraktometer und ein Fraktionssammler werden zusätzlich angeschlossen. Die aufgetrennten Fraktionen werden später auf dem Zuckeranalysator untersucht.

8. Trennung mit dem Zuckeranalysator

Für die quanitativen Analysen der Produktverteilung wird ein Zuckeranalysator verwendet.

Das Flußschaltbild des Zuckeranalysators ist in Abb. 121 schematisch dargestellt.

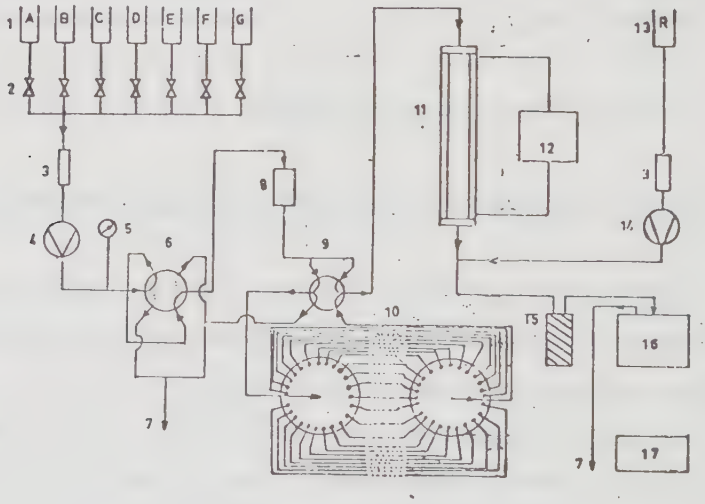


Abb. 121: Flußschaltbild des Zuckeranalysators.

1) Puffervorratsgefäße, 2) elektr.Ventile, 3) Luftblasenfalle, 4) Micro-Dosier-Pumpe, 5) Manometer, 6) Handumschaltventil (stop-flow), 7) Abfluß, 8) Vorwaschsäule (9 x 80 mm; Dowex 1x4, 200-400 mesh), 9) Handumschaltventil (by-pass), 10) automatischer Probengeber (24 Schleifen), 11) Trennsäule (6 x 240 mm, Durrum DA-X-4-11, 11 $\pm$ 1 µm , 12) Thermostat, 13) Reagens, 14) Reagens-Pumpe, 15) Reaktions-Coil (PTFE, 0.5 mm x 30 m, 100°C), 16) Photometer (420/570 nm), 17) Schreiber.

Die Puffervorratsgefäße (Boratpuffer: 0,1 - 1,6 Mol/l H_3BO_3, pH 7,5 - 10,5) sind über elektrische Ventile und eine Luftblasenfalle mit einer Milton-Roy-Hochdruck-Mikro-Dosier-Pumpe (0,8 ml/min) mit Manometer verbunden. Die Elutionspuffer werden druckseitig über eine Vorwaschsäule (DOWEX 1 x 4; um Verunreinigungen aus den Puffern zu retardieren) zu einem automatischen Schleifen-Probengeber (9 bzw. 24 Positionen) geleitet und gelangen von dort zur Trennsäule. Es werden hochdruckstabile, zugentlastete Glassäulen verwendet, die thermostatisierbar und mit stark basischen Polystyrol-divinylbenzol-Ionenaustauschern (DA-X-4-20 bzw. DA-X-4-11) einer Korngröße von 20 $\pm$ 5 bzw. 11 $\pm$ 1 m der Firma Durrum, Palo Alto, USA gefüllt sind.
Das von der Säule kommende Eluat wird mit dem Reagenz, bevorzugt mit einem modifizierten Fehlings Reagenz zur Detektion reduzierender Zucker oder dem Periodat/Acetylaceton-Reagenz zur Detektion von Monosacchariden, Polyolen und Zuckersäuren, das durch eine modifizierte Mikrodosierpumpe (0,66 ml/min) gefördert wird, gemischt und der Farbstoff in einem Reaktionscoil aus PTEE bei 100° C entwickelt, Coil-Querschnitt und -Länge sind so berechnet, daß sich eine Verweilzeit von 3,5 - 4 min ergibt. (im Allgemeinen 0,5 mm x 30 m)

Anschließend wird der entstandene Farbstoff in einm Filter-Photometer bei 420 bzw. 570 nm kontinuierlich vermessen und durch einen Schreiber graphisch dargestellt.

Die Erfassungsgrenze liegt je nach Zucker zwischen 0,1 und 2 nMol. Der Variationskoeffizient der Retentionszeiten beträgt 2 - 5%, die quantitative Auswertung der Peaks 2 - 3%.

Zucker bilden mit Borationen entsprechend ihrer Stereochemie anionische Komplexe unterschiedlicher Stabilität. Diese Anionen treten mit dem Säulenmaterial, einem stark basichen Ionenaustauscher, in Wechselwirkung und lassen sich in dieser Form trennen. Die Stabilität dieser Komplexe und damit das Elutionsverhalten, kann in Abhängigkeit von der Stereochemie des Liganden durch Variation des pH-Wertes der Elutionspuffer und der Säulentemperatur entscheidend beeinflußt werden.

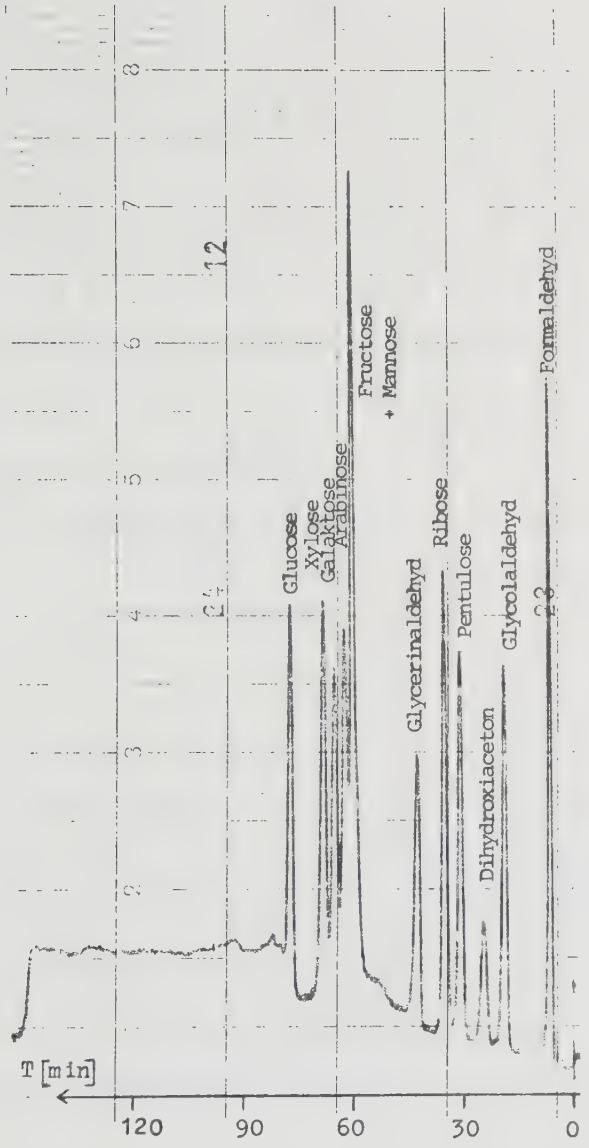


Abb. 122 : Standard-Chromatogramm eines Zuckergemisches

Erläuterungen zur Abb. 121 :

Säule: 6 x 240 mm, Durrum DA-X-4-11, 11 ± 1

Säulentemperatur: 45° / 65° C, Durchfluß: 0,8 ml/min

Boratpuffer: A: 0,2 Mol/l pH 9,2 (8 min)

B: 0,4 Mol/l pH 9,3 (39 min)

C: 0,6 Mol/l pH 9,4 (30 min)

D: Reg.puffer: 81 g H_3BO_3 + 36 g KOH

in 1 l dest. H_2O (75 min)

Säulenrückdruck: 40 bar, Detektion: Periodat/Acetylaceton

Schreiberempfindlichkeit: 0 - 0,5 EE

Aufgetragene Menge: 60 nMol je Komponente

Farbreagenzien:

a) Periodat/Acetylaceton

Reagenz A: 2 g Natrium(-meta)-perjodat

150 g Ammoniumacetat

100 ml Essigsäure

900 ml dest. Wasser

Die Lösung wird auf pH 4,0 mit konzentrierter H_2SO_4 eingestellt.

Reagenz B: 10 g Natrium-meta-arsenit

100 g Natriumacetat

200 ml Essigsäure

10 ml Acetylaceton

790 ml dest. Wasser

Bei Reagenz B wird Natrium-meta-arsenit und Natriumacetat zuerst in 600 ml dest. Wasser gelöst, dann gibt man 250 ml Essigsäure dazu. Erst zum Schluß wird Acetylaceton zugegeben.

b) Bis-cinchoninat

Lösung 1: 207 g Kaliumcarbonat in 750 ml dest. Wasser

Lösung 2: 2,5 g Kaliumcarbonat
1,8 g Asparaginsäure
0,5 g $CuSO_4 \times 5\ H_2O$
in 100 ml dest. Wasser

Lösung 3: 1 g Bis-cinchoninat in 250 ml dest. Wasser

Nachdem alle Lösungen vollständig gelöst sind, wird Lösung 2 zu Lösung 1 zugegeben. Dann wird zu dieser Mischung unter Rühren Lösung 3 zugegeben. Schließlich wird die bereits fertige Mischlösung mit dest. Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

9. Darstellung von reduziertem Zucker durch Hydrierung mit Natriumborhydrid ($NaBH_4$)[36]

2o mg Zucker werden in 1 ml dest. Wasser gelöst, dann gibt man 10 mg $NaBH_4$ zu und läßt über Nacht reagieren. Danach wird der Überschuß von $NaBH_4$ bzw. die Na-Ionen mit einem Kationenaustauscher DOWEX 50 WX 8 (H^+-Form) entfernt. Die Proben werden abfiltriert und im Rotationsverdampfer eingeengt. Anschließend wird mehrmals mit Methanol versetzt, um die Borsäure in Form ihres flüchtigen Borsäuretrimethylesters abzuziehen.

10. Darstellung von deuteriertem Zucker

Bei dem Verfahren zur Darstellung von reduziertem Zucker wird hier $NaBD_4$ in D_2O anstatt $NaBH_4$ in H_2O verwendet.

11. Gaschromatographie - Massenspektrometrie

a) Derivatisierung

0,5 mg reduzierter Zucker wird in ca. 200 µl getrocknetem Pyridin gelöst (im Ultraschallbad oder Heizblock bei 70° C). Danach werden 50 µl 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan und anschließend 20 µl Chlortrimethylsilan zugegeben.

b) Gaschromatographie

Die Proben werden an einen Gaschromatographen FRACTOVAP Modell 2150 ("CARLO-ERBA") mit Flammenionisationsdetektor (=FID) auf einer Quarzkapillarsäule DURABOND DB-5

(50 m x 0,25 mm i.D.) gemessen.

Als Trägergas wird Wasserstoff (Vordruck 0,4 bar) verwendet.

Temperaturprogramm ist wie folgt:

T_1 = 60° C, R_1 = 4° C/min

T_2 = 140° C, R_2 = 2° C/min

T_3 = 240° C, 30 min

c) Gaschromatographie - Massenspektrometrie

Es wird ein VARIAN MAT 1125 mit Data System SPECTROSYSTEM MAT 200 mit Elektronenpakt bei 80 eV verwendet. Die Ionenquelle dient als Detektor.

Temperaturprogramm wie bei der gaschromatographischen Trennung.

Herrn Graeme Nicolson danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Literatur

J.Stanek, M.Verny, J.Kocourek and J.Pacak, The Monosaccharides, Academic Press, New York, 1963

W.Pigman and D.Horton, The Carbohydrates, Academic Press, New York, 1972

R.J.Ferrier and P.M.Collins, Monosaccharide Chemistry, Penguin Books Ltd., London,1972

1) A.Butlerow, Liebigs Ann. Chem., 120, 295 (1861)

2) A.Kusin, Ber. dtsch. chem. Ges., 69, 1041 (1936)

3) W.Langenbeck, Angew. Chem., 61, 186 (1949)

4) A.H.Weiss, M.M.Sakharov et.al., J. of Catal., 45, 356 (1976)

5) E.Pfeil und H.Ruckert, Liebigs. Ann. Chem., 641, 121 (1961)

6) R.Mayer und L.Jaschke, Angew. Chem., 72, 635 (1960)

7) H.Schmalfuß und M.Congehl, Biochem. Z., 185, 70 (1927)

8) R.Schäffer und A.Cohen, J. Org. Chem., 28, 1929 (1963)

9) R.Schäffer, J. Org. Chem., 29, 1471 (1964)

10) G.Harsch, Dissertation, Univ. Tübingen (1977)

11) L.L.Orestov, Russ. J. Phys. Chem., 40, 1351 (1966)

12) M.Harsch, Dissertation, Univ. Tübingen (1979)

13) E.Pfeil und G.Schroth, Z. Analyt. Chem., 134, 333 (1952)

14) M.L.Wolfrom and A.Thompson, Method of Carbohydrat Chem., Band II, p. 65 (1963)

15) L.D.Hayward and I.G.Whright, Method of Carbohydrat Chem., Band II, p. 258 (1963)

16) M.Dizdaroglu, D.Henneberg und C.von Sonntag, Organic Mass Spectrometry, Vol. 8, 335 (1974)

17) G.Harsch, W.Voelter und H.Bauer, Z. Naturforsch., 32, 826 (1977)

18) H.Tambawala, A.H.Weiss, J. Catal., 26, 388 (1972)

19) W.Langenbeck, Naturwiss., 1, 30 (1942)

20) H.Drechsel, Dissertation, Dresden (1963)

21) H.Ruckert, Dissertation, Marburg (1962)

22) R.Mayer, K.Runge und H.Drechsel, Z. Chem., 3, 134 (1963)

23) V.Prey, E.Waldmann, H.Berbalk und F.Sommer, Monatsch. Chem., 83, 1344 (1952)

24) J.Lehmann, Chemie der Kohlenhydrate, George Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

25) K.Bernhauer und H.Wolf, Biochem. Z., 212, 443 (1929)

26) H.Tsuchida, S.Fujii and M.Komoto, Nogei Kagaku Heu, 6, 73 (1964)

27) L.T.Kovats et.al., C.A., 4, 55779 (1970)

28) K.Koizumi et.al., Yakugaku Zasshi, 94, 232 (1974)

29) G.Machell and G.N.Richards, J. Chem. Soc., 1924 (1960)

30) G.Machell and G.N.Richards, J. Chem. Soc., 1932 (1960)

31) Glattfeld et.al., J. Amer. Chem. Soc., 40, 987 (1918)

32) G.Machell and G.N.Richards, J. Chem. Soc., 1938 (1960)

33) M.L.Wolfrom and W.L.Lewis, J. Amer. Chem. Soc., 50 (1928)

34) H.S.Isbell, J. Res. Nat. Bur. Stand., 32, 45 (1944)

35) P.A.Shafer, T.E.Friedemann, J. Biol. Chem., 86, 345 (1930)

36) M.H.Adams, R.E.Reeves and W.F.Goebel, J. Biol. Chem., 140, 653 (1941)

37) C.M. McCloskey, Advance of Carbohydrate Chemistry, 12, 146 (1957)

38) G.Petersson, Dissertation, Göteborg/Sweden (1974)

39) G.Petersson, Organic Mass Spec., Vol. 6, 565 (1972)

40) J.Havlicek, G.Petersson and O.Samuelson, Acta Chem. Scand., 26, 2205 (1972)

41) G.Petersson, Organic Mass Spec., Vol 6, 577 (1970)

42) G.Petersson, Tetrahedron, Vol. 26, 3413 (1970)

43) G.Petersson, Tetrahedron, Vol. 25, 4437 (1969)

44) J.Dieckmann, J.B.Thomson, C.Djerassi, J. Org. Chem., Vol. 33, 2271 (1968)

45) C.A.Lobry de Bruyn and Alberda van Ekenstein, Rec. Trav. Chim., 14, 156, 203 (1895); 15, 92 (1896); 16, 241, 257, 262, 274, 282 (1897); 18, 147 (1899); 19, 1 (1900)

46) W.Alberda van Ekenstein and J.J.Blanksma, Rec. Trav. Chim., 27, 1 (1908)

47) J.Speck,Jr., Advan. Carbohyd. Chem., 13, 63 (1958)

48) H.Bauer and W.Voelter, Chomatographia, 9, 433 (1976)

49) D.M.Vyas, H.C.Jarrell and W.A.Szarek, Can. J. Chem., 53, 2748 (1975)

50) C.C.Sweeley et.al., J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497 (1963)

51) W.A.König, H.Bauer, W.Voelter und E.Bayer, Chem. Ber. 106, 1905 (1973)

52) E.Bayer und R.Widder, Liebigs Ann. Chem., 686, 181 (1965)

53) K.Biemann, D.C.De Jongh und H.K.Schnoes, J. Amer. Chem. Soc., 85, 1763 (1963)

54) M.Harsch, H.Bauer und W.Voelter, Z. Naturforsch., 38^{b}, 1269 (1983)

Lebenslauf

Name	: Hernanto, Alexius Ridwan
Geburtsdatum und -ort	: 26.November 1947, in Semarang/ Indonesien
Staatangehörigkeit	: Indonesier
Familienstand	: verheiratet, 1 Kind
Schulausbildung	: in Semarang/Indonesien 1954 - 1960 Volksschule 1960 - 1963 Mittelschule 1963 - 1967 Oberschule mit Abschlussprüfung im Oktober 1967
Feststellungsprüfung	: September 1968 in Tübingen (entspricht dem deutschen Abitur
Studium	: Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen von 1968 bis 1977 mit Abschluss Diplom. Thema der Diplomarbeit: Darstellung von Polystarolboronsäure-Gelen und metallkatalisierte Isomerisierungsreaktionen von Aldosen in alkoholischer Lösung." Seit 1977 Doktorarbeit unter Leitung von Prof.Dr.W.Voelter am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen. Seit 1979 als Mitarbeiter/wiss. Angestellter im Hauptlabor der chirurgischen Klinik der Univ. Tübingen, Leitung Prof.Dr.W.Heller.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:
H.Bauer, E.Bayer, E.Breitmaier, G.Häfelinger, S.Kemmler-Sack, G.Kortüm, H.Krüger, D.Krug, E.Lindner, I.-P.Lorenz, H.Mauser, Eu.Müller, D.Oelkrug, G.Opitz, W.Rüdorff, W.Schweizer, F.Seelig, H.Suhr, E.Stumpp, W.Voelter und W.Zeil.

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Bismarckstr. 116/6
D-7410 Reutlingen, Tel. 0 71 21/4 53 77